

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

(57) [Claim(s)]

[Claim 1]A device characterized by comprising the following for pretreatment of a test sample containing a particle ingredient which should be analyzed.

A sample inlet section.

A sample circulation way which has this inlet section and an exit part which has a fluid transfer relation.

A separator which has an upper confrontation portion which forms an isolation region where it is arranged between said inlet section and an exit part, and said particle ingredients are collected on said sample circulation way.

An inlet part which it becomes from a distribution channel which is open for free passage with said isolation region, and sends out a collected particle ingredient from said isolation region and to which this channel shows a conveyance fluid exceeding an upper confrontation portion of said separator into said isolation region, It has a sending portion which shows said conveyance fluid to a method of the outside of said isolation region exceeding an upper confrontation portion of said separator, and at least one of the at least one size specifications in said circulation passage and said circulation channel is a meso scale.

[Claim 2]it is the thing according to claim 1, and size specifications of said circulation passage are few -- one being a meso scale and, Including a flow restricted space where said separator restricts a flow in said circulation passage, at least one of the size specifications of this flow restricted space is a meso scale smaller than the minimum meso scale size in said circulation passage, and. A test sample pretreatment system which consists of being formed in separating said particle ingredient from said test sample of at least one sufficiently small circulation space.

[Claim 3]A test sample pretreatment system which consists of consisting of being the thing

according to claim 2, said at least one circulation space having at least one folding part, and said at least a part of circulation space carrying out rectangular extension to said circulation passage in this folding part.

[Claim 4]A test sample pretreatment system which consists of being covered with covering which it is a thing given in any 1 paragraph to claims 1-3, and said circulation passage and said distribution channel were formed in the surface of a rigid substrate, and was attached to said surface.

[Claim 5]A test sample pretreatment system which consists of being the thing according to claim 4 and being the shape of at least one height of standing up from said substrate a flow to which said separator is in said circulation passage, and met said circulation passage of a test sample being restricted.

[Claim 6]A test sample pretreatment system which is the thing according to claim 4 or 5, and consists of said covering being transparent.

[Claim 7]A combination device with an installation base part used for any 1 paragraph characterized by comprising the following to claims 1-6 with a sample pretreatment system and this device of a statement.

Said installation base part is an electrode holder of said device.

A test sample inlet slot connected internally with a sample inlet section of said device.

A screw style to which a test sample is moved along said circulation passage.

[Claim 8]A combination device which is the thing according to claim 7 and consists of said installation base part containing a reservoir machine of said test sample further.

[Claim 9]The thing comprising according to claim 7:

A conveyance fluid inlet slot where said installation base part was further connected internally with said inlet part of said distribution channel.

A screw style to which a conveyance fluid is moved along with said distribution channel.

[Claim 10]A combination device which is the thing according to claim 9 and consists of said installation base part containing a reservoir machine of said conveyance fluid further.

[Claim 11]An analysis target subject decision system which consists of a flow system characterized by comprising the following, and an exit part of a circulation passage of said sample pretreatment system opens for free passage with said sample inlet section of a sensing device of said analysis target subject.

A rigid substrate it hits to any 1 paragraph to claims 1-6 by a system which becomes final and conclusive an analysis target subject in a fluid sample which consists of a sample pretreatment system of a statement, and a sensing device of an analysis target subject and with which a sample inlet section is formed for a sensing device of said analysis target subject.

A detection area which has a reagent which generates a detectable output which has said inlet section and a fluid transfer relation, reacts to said analysis target subject, and may become final and conclusive said analysis target subject.

A detector which detects said output.

[Claim 12]In [ are the thing according to claim 11 and ] a sensing device of said analysis target subject, An analysis target subject decision system which a sample distribution channel is connected internally with said inlet section and said detection area, and consists of at least one of the at least one size specifications in said detection area and said sample distribution channel being a meso scale.

[Claim 13]An analysis target subject decision system which consists of being the thing according to claim 11 or 12, and being a cementing material which said especially reagent combines with said analysis target subject.

[Claim 14]An analysis target subject decision system which consists of being the thing according to claim 13, said analysis target subject being an antigen, and said cementing material being an antibody.

[Claim 15]An analysis target subject decision system which consists of being the thing according to claim 13, said analysis target subject being a ligand, and said cementing material being a receptor.

[Claim 16]An analysis target subject decision system which consists of being the thing according to claim 13, said analysis target subject being a nucleic acid molecule of a predetermined chain, and said cementing material being a nucleic acid molecule which has the chain of a source of complementary or the same to a chain of said analysis target subject.

[Claim 17]The thing comprising according to claim 11:

An analysis apparatus which analyzes an amplification reaction of predetermined polynucleotide of cell origin is included further, A polynucleotide amplifying region where said analysis apparatus comprises a rigid board and a flow system with which a sample inlet section is formed, and said flow system contains a reagent which amplifies polynucleotide and which has said inlet section and a fluid transfer relation.

It has a elution means to face between said polynucleotide amplifying regions which elute a sending portion and said cell of a distribution channel of said sample pretreatment system, and a sample inlet section of said analysis apparatus and a sending part of a circulation channel of said sample pretreatment system have a fluid transfer relation mutually.

[Claim 18]. Are the thing according to claim 17 and were connected internally with an inlet section of said device, and said polynucleotide amplifying region. A definite system of an analysis target subject which consists of at least one of the size specifications being a meso

scale at least of the sample distribution channels connected to said polynucleotide amplifying region and this including further a sample distribution channel in said analysis apparatus.

[Claim 19]It is a combination system with an installation base part used for any 1 paragraph to claims 11-16 with a definite system and this system of a statement, A combination system which consists of a screw style to which said installation base part moves an electrode holder of said system, an inlet slot of a test sample connected internally with a sample inlet section of said sample pretreatment system, and a test sample along a circulation passage of said conductor pretreatment system.

[Claim 20]A combination system by which it is the thing according to claim 19, and said installation base part is further provided with a reservoir machine of said test sample.

[Claim 21]It is a combination system with an installation base part used with a system according to claim 17 or 18 and this system, An inlet slot of a test sample where said installation base part was connected internally with a sample inlet section of an electrode holder of said system, and said sample pretreatment system, An inlet slot of a screw style to which said test sample is moved along a circulation passage of said sample pretreatment system, and a conveyance fluid connected internally with said inlet section of a distribution channel of said sample pretreatment system, and a combination system which consists of a screw style to which said conveyance fluid is moved along with said distribution channel.

[Claim 22]A combination system which is the thing according to claim 21 and consists of said installation base part containing a reservoir machine of said conveyance fluid further.

[Claim 23]A combination system which is the thing according to claim 21 or 22, and consists of said installation base part containing a detector which detects a parameter of said test sample in said analysis target subject sensing device or said polynucleotide analysis apparatus further.

[Claim 24]A system which analyzes an amplification reaction of predetermined polynucleotide of cell origin, comprising:

A rigid substrate with which said system comprises an amplifying device which performs the sample pretreatment system according to claim 1 and polynucleotide amplification, and a sample inlet section is formed for said amplifying device.

A polynucleotide amplifying region which has said inlet section and a fluid transfer relation including a reagent which amplifies polynucleotide.

A elution means in said reaction region for eluting said sample distribution channel, a polynucleotide amplifying region which has at least one meso scale size, and said cell.

[Claim 25]In [ are the thing according to claim 24 and ] said polynucleotide amplifying region, An analyzing system which said sample distribution channel connects internally said inlet section and said polynucleotide amplifying region, and consists of at least one of the at least

one size specifications in said polynucleotide amplifying region and a sample distribution channel connected to this being a meso scale.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION****[Detailed Description of the Invention]**

Reference related application U.S. patent application 07th as of :May 1, 1992 this the application of whose is application of partial continuation of the patent application under next pendency / No. 877,702;. It is U.S. patent application 07th / divisional application of No. 877,563 which is U.S. Pat. No. 5,304,487. U.S. patent application 08th as of February 14, 1994 / No. 196,021;. Were abandoned now. U.S. patent application 08th as of May 26, 1994 which is U.S. patent application 07th / continuation application of No. 877,702 / No. 250,100; U.S. patent application 08th as of September 19, 1994 which is U.S. patent application 07th / continuation application of No. 877,662 abandoned now / No. 308,199. The whole indication is used for reference in this application specification at an above-mentioned patent and patent application.

The background of an invention This invention relates to the sample pretreatment system which has a small size, promotes effective pretreatment of a test sample [ minute amount / whole blood ], and becomes final and conclusive the quality of an analysis target subject which exists in a test sample, and/or is processed. This invention relates to the test system containing the device of the similar size designed so that various assay protocols which include amplification of the preselected polynucleotide, such as polymerase chain reaction (PCR), for example might be performed simultaneously with analysis, and an above-mentioned device.

the protocol, test instrument, and device of a large number which are various causative analyses and the purpose of surveillance technically, and perform analysis of a biological sample in these ten years have been developed. Immunoassay, immunity fixed-quantity assay, coagulation reaction assay, polynucleotide amplification, All the analysis methods including the internal reaction of various ligand-receptors and deviation movement of the kind in a compound sample have been used in order that various biological derivations may become

final and conclusive existence of a pollutant and existence of the cell of quantity and a specific form.

The disposable device was developed by the small size for dealing with a biological sample and doing a specific clinical examination these days. Use of the small blood-gas-analysis machine formed on the silicon wafer is reported by Shoji and others. . [, such as Shoji, ], SANSA and actuator, and No. 15;101-107 (1988). The cytogamy technique which uses a detailed machinery silicon device is reported by Sato and others. . [, such as Sato, ], SANSA and actuator, and No. A21-A23:948-953 (1990). The laser beam degree meter of microprocessor control which detects blood coagulation was manufactured by the tibia Corning diagnostics company (U.S.).

Ultra-fine processing technology is developed in the detailed electronic field at first. . [, such as Angel, ], SANENTIFIKU American, and No. 248:44-55 (1983). Ultra-fine processing technology enabled manufacture of the detailed engineering device which has a manufacture element of a detailed size of the range from 10 microns (size of a biological cell) to NANOMETA (size of some biological polymers). For example, many experiments which report the data which has an above-mentioned small structure are included in research of detailed mechanics, such as mechanical behavioral characteristics and flowability. In life science, the potential capability of the above-mentioned device is not fully utilized.

The action of silicon, titanium coating polymer, the fibrocyte in Mizouchi of the prototype, and epithelial cells was studied by bull NETTE (Exper.Cell Res., No. 167, 203-217 (1986) and No. 164, 11-26 (1986)). McCartney and others (Cancer Res. and No. 41:3046-3051 (1981)) experimented in the action of the tumor cells in a plastic base with a slot. The flow of the leucocytes in a detailed capillary tube and red corpuscles was studied in order to acquire the opinion in detailed circulation by RASERU (Blood Cells. and No. 12;179-189 (1986)). Although research of the hydrodynamics in detailed machinery is reported by Fung and Weizman, the data relevant to an analysis apparatus is not obtained. . [, such as Fung, ], Med.and Biol.Engineering, and No. 9:237 3245 (1971); . [, such as a one-two man, ], Am.Inst.Chem.Eng.J., and No. 17:25-30 (1971). In order for Columbus etc. to separate a specific ion electrode in the experimental testing device of many channels, the sheet of two sheets which carried out coining of the V character-like slot of the direction which intersects perpendicularly when controlling the capillary tube style of biological fluid, and laminated it was used. ., such as Columbus, Clin.Chem., No. 33:1531-1537 (1987). Use of the fluid distribution chamber for handling operation (for example, cell fusion) of a cell was reported by Masuda et al., Washizu and others. ., such as Masuda, an IEEE/IAS meeting report, the pages 1549-1553 (1987); ., such as Washizu, an IEEE/IAS meeting report, the pages 1735-1740 (1988). This art was not fully examined about potential use of the detailed engineering device for decision of a fluid sample and the quality of an analysis target subject especially in the field of biological

analysis.

The biological analysis using polynucleotide amplification art is known well (for example, ., such as MANISUCHISU, molecular cloning: refer to experiment manual and cold spring harbor laboratory publishing company:1989 and the page 14.1-14.35). One of such the art is PCR amplification, and this Heat stable polymerase, On for example, tuck DNA polymerase (. [, such as Ching ], J.Bacteriol., and No. 127:1550 (1976)), a nucleoside-triphosphate salt, and a different chain. Using two oligonucleotides which have a complementary chain to the chain which exists on the spiral structure of the both ends of template DNA, it can perform on a DNA template and this is located in the side of the DNA fragment (ply Mars) which should be amplified. A reaction component circulates between a higher temperature (for example, 94 \*\*) for removing hybridization of template DNA of double helical conformation, and a lower temperature (for example, 65 \*\*) for annealing following this, and a polymerization. Almost exponential amplification of template DNA is given by the circular reaction repeated between the temperature of dehybridization, and annealing and the temperature of a polymerization. The device which performs an PCR chain reaction automatically using temperature circulation is marketed (Perkin-Elmer).

PCR amplification Diagnosis of a genetic disorder (. [, such as ene GERUKU, ], Proc.Natl.Acad.Sci., and No. 85:544 (1988)), Detection of a nucleic acid chain of the pathogenic microorganism in a clinical sample (. [, such as OU, ], science, and No. 239:295 (1988)), \*\*\*\* proof (. [, such as Lee, ], Nature, and No. 335:414 (1988)), for example, hereditary specification of sperm, It is used for analysis of the mutation in the various features (Oste, biotech Knicks, and No. 6:162 (1988)) of the activated oncogene (fairness, \*\*, Proc.Natl.Acad.Sci., and No. 85:1629 (1988)) and a clone molecule. The formation of the specific chain of double-helical-conformation DNA by which clone formation was carried out which uses PCR assay as a probe, It can be used for wide range uses, such as formation of a lot of DNAs for formation of the specific probe for a non-clonal inheritance child, formation of the collection thing of a little mRNA(s) to cDNA, and a chain, and analysis of mutation, by the selective amplification of a cDNA fragment. The quick system is needed for the convenience for performing polynucleotide amplification which can be clinically used in the wide range potential use in the clinical examination of the examination for paternity specification, an examination of a genetically determined disease or an infection disease, etc.

It does not automate, but most present analytical skills used for decision of the microorganism need culture in a suitable medium in order to make the number of organizations usually increase, and generally the technique visual because of the system of a subject or subspecific specification and/or chemical is adopted. A peculiar delay in this technique often needs medical assistance before the final specification of an infectious disease. In industry, public health, or clinical environment, an above-mentioned delay invites an unhappy result. The



useful device which detects a microorganism promptly is needed.

It is providing the sample pretreatment system used with the analysis apparatus of the relation which can specify the substance which can analyze a fluid sample to boil the purpose of this invention in small quantities dramatically promptly and efficiently, and exists in a fluid sample by very low concentration. . Other purposes contain an intracellular molecule, for example, DNA, in the range of a biological use or other uses. It is providing the device of the small size (it is 1 cc or less at volume) which can promote quick and automatic analysis of the quality of an analysis target subject of the shape of a preselected molecule, or the shape of a cell, which has the structural element by which detailed formation was carried out and which can be thrown away. The examination of the infectious disease of the clinical examination with the quick purpose of further others of this invention, for example, viral nature, and bacteria nature, It is providing improvement of an above-mentioned device which can be respectively used for the examination of the pollutant in the examination of genetic separation, the examination of sperm motility, the examination of the blood characteristic, food, body fluid, and allied substances, etc.

Outline of an invention This invention provides the sample pretreatment system which gives the particle ingredient for various biological analysis and other analysis, for example, the minute amount fragment of the test sample containing a cell, with sufficient convenience and by which detailed formation was carried out. This invention provides the analyzing system containing the sample pretreatment system with which detailed formation of this invention was carried out with the device which performs the sensing device of the quality of an analysis target subject by which detailed formation was carried out, for example, an immunological examination device, and polynucleotide amplification, and by which detailed formation was carried out.

The sample pretreatment system of this invention contains the separator arranged between the sample circulation passage which has a sample inlet section which has a fluid transfer relation, and a sample exit part, and an inlet section and an exit part. This separator has an upper confrontation portion which forms an isolation region in a circulation passage, and the particle ingredients which exist in a fluid sample are collected in an isolation region. This can send out the collected particle ingredient now from an isolation region including the distribution channel which has an isolation region and a fluid transfer relation preferably as for this device. This distribution channel contains the inlet part guided exceeding the upper confrontation portion of a separator while guiding a conveyance fluid into an isolation region, and the sending part which it shows to a way outside a separator while guiding a conveyance fluid exceeding the upper confrontation portion of a separator. At least one circulation passage and a distribution channel portion have at least one meso scale size, as characterized by next explanation.

According to one embodiment of this invention, a circulation passage has at least one meso scale size, This is formed in it being smaller than a meso scale size at least, and separating a particle ingredient from a fluid sample of a circulation passage including the restricted circulation field [ in / in a separator / a circulation passage ] of at least one circulation way portion which has at least one meso scale size small enough.

Using publicly known detailed assembly art, the sample pretreatment system of this invention is provided with the circulation passage and distribution channel which were formed in the surface of a rigid base, and can be manufactured. In the desirable embodiment, the surface of the base in which a structural element is formed is covered with the transparent glass cover or transparent plastic hinged cover attached to covering, for example, the surface.

Especially the meso scale sample pretreatment system of this invention is suitable for being used in relation to the meso scale polynucleotide amplifying device which are a meso scale sensing device which are U.S. patent application 07th under pendency / object of No. 877,702, and/or U.S. patent application 08th under pendency / object of No. 308,199. When mentioned later, the whole indication of application of '702 No. and '199 No. is fully used by being referred to by this application, as annotated by \*\*\*\*.

Although an above-mentioned meso scale device is explained still in detail later, it can be used in various combination so that it may function as an analyzing system. In one embodiment, use \*\* of the device can be carried out at analysis of the test sample containing a cell. The fragment of the test sample given by the sample pretreatment system of this invention can be analyzed simultaneously continuously or fundamentally.

Although the meso scale sensing device can become final and conclusive various analysis target subjects, This is constituted from a distribution channel by a rigid base, a meso scale circulation system, and the selection target, Detailed formation of the rigid base is carried out so that a sample inlet part may be determined, and the distribution channel is connected internally to the inlet part and the analysis detection area including the analysis detection area which has a fluid transfer relation to an inlet part as for a meso scale circulation system. When there are at least one analysis detection area and sample distribution channel, these have at least one meso scale size. A reagent is formed in the detection area of an analysis target subject, this reacts to an analysis target subject, and a detectable output which may become final and conclusive an analysis target subject is generated. In one embodiment, reagents are a cementing material and a cementing material which is selectively fixed on a fixed base material or a movable base material in a detection area, and is combined especially with an analysis target subject. The detector for detecting an above-mentioned output is contained, and this permits decision of the analysis target subject in a test sample.

The polynucleotide amplifying device of a meso scale is constituted from a distribution channel by a rigid base, a meso scale circulation system, and the selection target, Detailed formation of

the rigid base is carried out so that a sample inlet part may be determined, and the distribution channel is connected internally to the inlet part and the polynucleotide amplifying region including the polynucleotide amplifying region which has a fluid transfer relation to the inlet part of a device as for a meso scale circulation system. At least one polynucleotide amplifying region and sample distribution channel have at least one meso scale size, when there is the latter. A elution means to elute the cell component of a biological test sample is formed in the sample circulation field upstream of the polynucleotide amplifying region. This device can be used in order to perform PCR, and a polynucleotide amplifying region contains a suitable reagent in this case, For example, double helical conformation is removed for every cycle, hula IMA is annealed to single spiral structure, and the means of the reagent which carries out a repetition temperature change is formed, such as controlling temperature so that the polynucleotide amplified between primers is compounded.

Each analysis apparatus explained here is contained in the scope of this invention regardless of whether it is used with the sample pretreatment system of this invention.

An above-mentioned device is used with the installation base part which usually functions as an electrode holder of a device, and an installation base part coincides 1 on a device, or two or more regio oralis with 1 in an installation base part, or two or more circulation lines. After test samples, such as whole blood containing an analysis target subject, are set to the entrance of a sample pretreatment system, the screw style which can be united with an installation base part or the device itself, for example, a pump, is adopted, and a sample circulates through an isolation region along a circulation passage. The sample which does not contain a particle ingredient is conveyed towards an analysis target subject sensing device from the sample pretreatment system where the former exit part has a fluid transfer relation to the latter inlet section. Particle ingredients, such as a formed object etc. of the blood cell which remains in an isolation region, or others, can be conveyed by the polynucleotide amplifying device through the sending part of the distribution channel of the sample pretreatment system which is sent out from an isolation region and has a fluid transfer relation to the inlet section of a polynucleotide amplifying device. On the other hand, a test sample can be poured into a sample pretreatment system, or this sample can advance into a meso scale sample pretreatment system through an entrance by operation of a capillary tube. It can be designed so that other reagents which also need an installation base part to perform analysis of a reagent, for example, the classified cementing material, a polynucleotide amplification examination, a puffer, or a request in a device may be poured in based on the analytical protocol selectively performed within an above-mentioned device.

The device and system of this invention can be used in order to perform automatically promptly the various clinical examinations containing the analysis target subject of a cell or a molecule moreover to high sensitivity, or in order to supervise growth of a reaction or a cell. Any

examinations including decision of the existence of existence of the analysis target subject of a molecule or ion or decision of concentration, decision of the specific existence of the cell of form, an intracellular gene linkage, or a recombinant DNA chain can be fundamentally performed well using the device and analyzing system of this invention. The quick chemical test which detects pathogenic bacteria or virus with these meso scale devices can be provided. The quick examination for existence of a constituent of blood, for example, hormone, or concentration can be provided with this device. Although not limited, other biological assaying methods, such as a blood group test, are included in a useful use.

The device and system of this invention can be easily sterilized before use. Being able to discard a device, after being able to terminate easily the examination performed using the device and system of this invention and completing an examination, this prevents contamination between samples, is potentially buried in a harmful substance, generates only a little waste fluid for abandonment, and enables cheap analysis.

while other effects and features of this \*\*\*\*\* are explained further and an accompanying drawing is referred to to a person skilled in the art -- below-mentioned this case -- it becomes clearer from a detailed description -- I will come out.

Easy Drawing 1 of explanation of a drawing is an outline perspective view showing the sample pretreatment system of this invention seen through the transparent cover.

It has a series of circulation spaces which restrict the flow of the test sample in which it is a top view in part and the separator passed through the circulation passage which shows other embodiments which carried out micro processing of the separator (filter form) of circulation with which Drawings 2 and 3 were restricted in the circulation passage which passed through the portion of a sample pretreatment system.

Drawing 4 is an outline sectional view of the sample pretreatment system of this invention combined with the installation base part which is useful to prepare the flow of the fluid which passed through the device while holding a device.

Drawing 5 is an outline top view showing the same device shown in Drawing 1, each of that exit part has the 1st and 2nd micro-processing analysis structured division and fluid transfer relations, and the micro-processing analysis structured division is designed so that analysis which became independent to the sample fragment given by a sample pretreatment system may be performed.

the -- the [A / 6 / figure and ] --B [ 6 ] figure is an outline sectional view which has the sample inlet section and fluid transfer relations of an analysis apparatus and in which showing the sample pretreatment system of this invention, in order that the exit part of the circulation passage from an isolation region may perform various assay protocols. both devices being shown combining an installation base part, and an installation base part holding a device and preparing the flow of the fluid which passes a device -- the [ and ] -- it is useful to detect the

differential pressure in the position in alignment with the flow of the fluid which passed the device in the embodiment shown in A [ 6 ] figure. the --A [ 6 ] figure shows the device compared in the transverse direction --; -- the --B [ 6 ] figure is accumulated and shows the device of arrangement.

Drawing 7 is an outline sectional view of the sample pretreatment system of this invention which has a sample inlet section of an analysis apparatus, and an exit part of the conveyance fluid distribution channel which has a fluid transfer relation, in order to perform polynucleotide amplification. Both devices are shown combining an installation base part, an installation base part holds a device, the flow of the fluid which passed the device is prepared, and it is useful to detect differential pressure by the position which meets the course of the flow of a fluid in which the device was passed.

the -- the [A / 8 / figure and ] --B [ 8 ] figure is an outline top view showing two analysis apparatus which meant using it with the sample pretreatment system of this invention. The device of the 8th the A figure has two meso scale circulation systems, and since selectively detects in order to capture an analysis target subject, each is connected internally by the single chamber by the distribution channel. the -- while B [ 8 ] figure performs enzyme immunology assay, the similar design which has two capture chambers is shown. Analysis target subjects, such as protein, can be captured, for example in the 1st chamber with a suitable immunological capture reagent, can be classified according to antibody-enzyme conjugate, and can be exposed to a color-enhancing base. An enzyme changes a base into the chromophoric group captured, for example with a suitable immunological capture reagent, and in the 2nd chamber, it condenses a chromophoric group and decreases the signal of a background. The 2nd chamber can be selectively used for a chromophoric group's detection in a similar manner.

Drawing 9 is an outline top view showing the analysis apparatus which meant using it with the sample pretreatment system of this invention, and by which micro processing was carried out. ; including the crookedness channel of a series in which it deals which coincides addition of the reagent used when this analysis apparatus performs various assay protocols, a penetrant remover, and its allied substances, and mixed timing -- the, as shown in A [ 9 ] figure, A single chamber for capture of an analysis target subject, and detection. being provided --; -- the --; whose B [ 9 ] figure is a partial enlarged drawing of the embodiment of other devices which has a capture chamber of an analysis target subject, and a detection chamber of the independent analysis target subject -- the --C [ 9 ] figure in an analytical region. It is a partial enlarged drawing of the embodiment of other devices including the branched circulation passage area which permits detection of an analysis target subject by restriction of a flow.

the --; which is an outline top view showing the analysis apparatus of other embodiments which A [ 10 ] figure is used with the sample pretreatment system of this invention, and perform

various assay protocols based on a minute amount sample

the --B [ 10 ] figure being an enlarged plan view showing a part of 1st circulation passage, and letting that pass -- sample fluid -- the --; introduced into the sample inlet part of the device shown in A [ 10 ] figure

the --C [ 10 ] figure -- the --; which is the partial cross-sectional view of the 1st circulation passage which met the 10C-10C line of B [ 10 ] figure, and shows the V character-like channel by which contiguity arrangement was carried out to the side which constitutes the 1st circulation passage

the --D [ 10 ] figure -- the --; which is partial drawing of longitudinal section of the 1st circulation passage in alignment with the 10D-10 D line of C [ 10 ] figure, and shows the specific structural feature of the barrier which separates a V character-like channel

the --A [ 11 ] figure being an outline top view of the intended analysis apparatus, and using it with the sample pretreatment system of this invention, ; which has a series of meso scale chambers suitable for an analysis apparatus performing various procedures including polynucleotide amplification of the classification of a cell, separation of a cell, PCR, etc. -- the --B [ 11 ] figure is an outline top view showing other designs for a meso scale PCR analysis apparatus.

the -- the [A / 12 / figure and ] --B [ 12 ] figure shows other embodiments of a separator which have been arranged at the circulation passage of the sample pretreatment system of this invention and which micro processing is carried out and restrict a flow -- it is a top view in part. the -- the [C / 12 / figure and ] --D [ 12 ] figure is a partial sectional view of a longitudinal direction showing the embodiment of further others of a separator which has been arranged at the circulation passage of the sample pretreatment system of this invention, and which micro processing is carried out and restricts a flow.

The similar reference mark shows the similar portion which appears in an accompanying drawing.

**DETAILED DESCRIPTION** The sample pretreatment system of this invention contains the rigid base which has the chip shape which has a size of the range of 1-several microns or less in thickness, area <sup>2</sup> of about 0.1 cm -, and 0.5-cm<sup>2</sup> preferably. A sample circulation passage is formed in this base in micro processing, and the sample circulation passage has a separator arranged in the middle between an entrance, an exit and an entrance, and an exit. The upper confrontation portion of a separator forms an isolation region in a circulation passage, and the particle ingredients of a test sample are collected in an isolation region. This functions as sending out the collected particle ingredient from an isolation region including the distribution channel which has a decollator and a fluid transfer relation as for this device. This distribution channel has an inlet part and a sending portion, an inlet part guides a conveyance fluid exceeding the upper confrontation portion of the separator in an isolation region, and a

sending portion shows the conveyance fluid in which the particle ingredient is floating to a way outside an isolation region. At least one of an above-mentioned circulation passage and the distribution channel portions has a size of a meso scale at least.

When the particle ingredient of a sample should not be analyzed, these can remain in an isolation region, it sets in that case, and a distribution channel does not function fundamentally, therefore it can be removed from a device.

Here, a "meso scale" expresses other structural elements, such as a circulation passage where at least one has at least one cross section size of the range which are 0.2 micrometer - 500 micrometers more preferably 0.1 micrometer - 1000 micrometers or a distribution channel and a reaction, and/or a detection chamber. The ranges of this circulation passage and 0.1 micrometer - 100 micrometers of depth with a preferred chamber are 2 micrometers - 50 micrometers more preferably. The ranges of 2 micrometers - 200 micrometers of desirable width of a circulation passage are 3 micrometers - 100 micrometers more preferably. The ranges of the width with a preferred chamber are 50 micrometers - 500 micrometers more preferably 0.05 mm - 5 mm. The range typically, sufficiently small although the quality of particulates is separated from most of a biological sample and other test samples of the width of the circulation passage in a separator is 50 micrometers or less. The circulation passage of a separator usually has a depth of about 0.1 to about 100 micrometers. The length of the circulation passage of a separator is within the limits of about 5 mm from about 0.1 micrometer.

The at least one sectional shape size which a circulation passage and other structure parts made a triangle, an ellipse form, a quadrangle, a rectangle, or other shape when it saw in a section, and passed through the given structure, or crosses the passage of the flow of the sample fluid into structure is a meso scale.

With the analysis apparatus explained here, \*\* of the meso scale of this invention promotes sample pretreatment in extensive biological analysis, and it makes it possible to become final and conclusive promptly the both sides of the molecular analysis target subject of the fine amount in various test samples, and a cellular analysis target subject. An end of analysis will discard a device typically.

For a person skilled in the art, using the publicly known various micro-processing techniques, the meso scale device provided with at least one circulation passage or other structural elements which have at least one meso scale size can be designed in mass production, and can be assembled from a rigid substrate material. To this technique, thin film vacuum evaporation art, such as spin coating and chemical vacuum evaporation, For example, the etching technique, LIGA process, or FURASU tic mold which can be performed by either one of laser processing, such as UV or an X ray process, or photolithograph art, a wet chemical process or the plasma process is contained. For example, trend yne Analytical Chemistry,

such as Manz No. 10: 144 to 149 (1991) reference.

After the sample pretreatment system of this invention forms a circulation passage and a separator in the surface of a suitable base, it can be manufactured by convenience by mounting covering on the surface. A rigid base and/or covering can be constituted by materials, such as silicon, polysilicon, silicon glass, thermo couple material, gallium arsenide, polyimide, a silicon nitride, and diacid-ized silicon. Covering and/or the base can comprise plastic material, such as an acrylic, polycarbonate, polystyrene, polyethylene, or other resin materials. Selectively, covering and/or the base can comprise a transparent material, for example, the comparatively thin glass layer combined in anode, or a sheet material made from a plastic by which ultrasonic welding was carried out. On the other hand, two bases of a similar material can be sandwiched or a suitable substrate material can be sandwiched between two transparent cover materials.

The outline of one embodiment of the meso scale sample pretreatment system of this invention is shown in Drawing 1. The detailed assembly of this device 10 is carried out into the suitable base 11, and the sample circulation passages 12a and 12b which have the sample inlet section 14 and the sample exit part 16 by this are formed. The separator 18 of filter form is inserted in the circulation passage between the inlet section 14 and the exit part 16. The isolation region 22 which collects the particle ingredients of a test sample is formed in the upper confrontation portion 20 of a separator. Including the distribution channels 24a and 24b which have the decollator 22 and a fluid transfer relation, a device distributes a conveyance fluid to an isolation region, and sends out the collected quality of particulates from an isolation region. The distribution channels 24a and 24b have the inlet part 26 to which it shows a conveyance fluid, for example, an isotonic buffer, exceeding the upper confrontation portion 20 of the separator 18 from a supply source (not shown). The sending portion 28 crosses the surface of a filter element, and conveys a conveyance fluid to a way outside the isolation region 22.

The detailed assembly of the separator 18 is carried out into the sample circulation passage 12a of a sample pretreatment system, and 12b, and it is useful to remove the quality of particulates from the test sample which passed the device before analysis. In one embodiment shown in Drawings 2 and 3, the separator is constituted by a series of meso scale circulation spaces with a small size as compared with the circulation passages 12a and 12b. In operation, the separator 18 functions as a filter, and while accumulating the quality of particulates in the inlet face 18a, the filtration materials which came out of the circulation space continue along the circulation passage 12b. The detailed assembly of the filter circulation space 19 is carried out by the depth and width of the range of about 5 micrometers thru/or about 50 micrometers, and the circulation passages 12a and 12b have the maximum depth and the maximum width of about 1000-micrometer grade in this case. As for a filter element, it is preferred that a detailed



assembly is carried out into the base of a device so that two or more at least one desirable projections in which the substrate material arranged in a circulation passage stood up in general may be formed, and it is useful for this to restrict the flow of the sample fluid which passed through the isolation region.

As shown in Drawing 2, the height P is formed in a way outside the upper confrontation portion of the separator 18, and it promotes preventing closing of a circulation space by the quality of particulates in sample fluid. The upper confrontation portion of the separator 18 is approached, a waste fluid reservoir (not shown) can be provided, and the insoluble deposits removed from sample fluid are collected.

As for the separator 18, as shown in Drawing 1, it is preferred that it is the stillness structure where it is fundamentally located fixed between the sample inlet section 14 and the exit part 16. On the other hand, however, a separator can also be temporarily arranged in a circulation passage. For example, the lump of magnetic body particles is held in the circulation passage 12a and each fixed position in 12b, and can make the quality of particulates filter from a test sample by operation of a magnetic field. The fluid part of a sample passes the crevice between particulates as a filtration thing. If suitable time passes, the applied magnetic field can be removed and magnetic body particles can be transported with the quality of particulates from the test sample accumulated there from a circulation passage for desired analysis or abandonment.

When required, the separator 18 can contain the reagent which promotes removing particles or output from a test sample. In the case of the biological sample containing the mixed cell population, the cementing material combined so that the cell of a specific form made into the target in a mixed population, for example and release are possible acts so that it may be absorbed by the separator, or may be fixed to it, and the cell of a target form may be removed or it may hold selectively. The cell which should not be held can be conveyed from an isolation region for abandonment. The held cell comes to be released after that for analysis.

The sample pretreatment system of this invention is shown by the sectional view to an installation base part, for example, Drawing 4, distributes a fluid to a different device which constitutes the analyzing system of this invention, sends out a fluid from a device, and can be used combining the installation base part 30 which conveys a fluid between devices. This installation base part 30 holds the device 10, and has the accommodation hollow 32 which coincides the regio oralis 14, for example, the regio oralis of the device 10, with the circulation line 33 in an installation base part. This installation base part sends a sample to the circulation passage of a device including the screw style 34, for example, the pump shown in Drawing 4. After a biological fluid sample with doubtful a specific analysis target subject being included is supplied to the entrance 35 of an installation base part, the pump 34 operates, it conveys at the sample entrance 14 of the device 10, and then the circulation passages 12a and 12b are

passed. Although the pump 34 is shown as an element of the installation base part 30, when required, it can also be built into the device 10 with publicly known ultra-fine processing technology. However, when a cost aspect is taken into consideration, it is preferred to arrange a pump to the installation base part 30. On the other hand, a sample can also be poured in into a device by the character of the analysis which should be performed, or a sample can also be made to advance into the circulation circulation space of a device through an inlet section by operation of a capillary tube. In other embodiments, an installation base part can also be arranged on a sample pretreatment chip, for example, loses covering on a device, is provided with the circulation line connected with the inlet section of the device so that [ that a sample is poured in into a device ] it might be permitted, and can be provided. The detailed assembling structure of a device can be filled up with the total volume of fluid pressure application, and it can be used for showing an installation base part so that the flow of a fluid may pass through the inside of structure by the valve located in a device or an installation base part. Unification of the valve into a detailed assembly silicon chip can be attained by a publicly known method by a technical field.

The exit part 36 of the installation base part 30 can be connected internally with the inlet section holding the analysis apparatus of form explained here of a similar installation base part, and the sample processed by ten in a device by this is sent to an analysis apparatus for an examination.

An analysis apparatus can be used combining an installation base part, in order to observe the contents of the meso scale circulation passage of a device, and other structured divisions. For example, the installation base part can contain a microscope (not shown), in order to observe the contents of the meso scale structured division in a device. As shown in Drawing 1, the transparent cover 29 serves as a window which makes it easy to observe the contents of a device dynamically.

The schematic diagram of the combination of the sample pretreatment system of Drawing 1 and the analysis apparatus 110 designed so that various joint assay protocols and polynucleotide amplification might be performed is shown in Drawing 5. In order to attain this purpose, the assay structured division 112 and polynucleotide amplification / assay structured division 122 are formed in the device 110. In the embodiment shown in Drawing 5, the exit part of the circulation passages 12a and 12b has the inlet section 114 and fluid transfer relations of the assay structured division 112 of a device, and the sending portion 28 of the; channels 24a and 24b has the inlet section 124 and fluid transfer relations of polynucleotide amplification / assay structured division 122. The examination used for assay, other examinations, or analytic execution can be introduced via the reagent inlet section 116 or each of 126. Typically, the reaction region 117 is established in the assay structured division 112, and generates a detectable output which a suitable reagent reacts to an analysis target subject there, and may

become final and conclusive an analysis target subject. So to speak, the formed quality of output is an output which gives the clear information as the character or quantity of an analysis target subject. This output is detectable with the gestalt generated in the reaction region, or the gestalt governed by the next reaction which can raise detection. Independent reaction / detection area 118 can be formed for this purpose.

Analysis target subject - The solution containing a specific cementing material can be introduced into the reaction region 117 via the inlet section (not shown) which has a reaction region and a fluid transfer relation. The protein cementing material introduced into solution can be held with the freeze-dried gestalt at the meso scale structured division. On the other hand, a cementing material is fixable in the meso scale chamber of an analysis apparatus, after being manufactured by physical adsorption or chemical adsorption by the magnetic or nonmagnetic polymer particulate arranged for example, the chamber surface or in movable and a rigid phase base material, for example, a chamber.

When performing polynucleotide amplification using the device 110, separation by either of the isolation construction that the cell of the object sent from the sending portion 28 of the sample pretreatment system 10 is explained to an eluent or above-mentioned U.S. Pat. No. 5,394,487 rules over. Target polynucleotide can be emitted from the cell which received amplification in the amplifying region 127, and the amplified polynucleotide can be detected in the detection area 128. In order that 1 or two or more openings 116, 119, 126, and 129 may exhaust a system, an opening can be carried out to the atmosphere. It will be explained further, operation of the joint assay structured division 112 and polynucleotide amplification / assay structured division 122 referring to other below-mentioned embodiments of this device.

As shown in Drawing 5, the assay structured division 112 and polynucleotide amplification / assay structured division 122 are formed on the base common as a single device, but although this structured division will become clear later, it is assembled on a separate base, and it can also function as a separate analysis apparatus or a chip.

when it is used together so that an above-mentioned sample pretreatment system and analysis apparatus may function as an analyzing system as shown in Drawing 5, this system is advantageous, for example -- the -- the [A / 6 / figure and ] -- it is combined with the installation base part of the form shown inB [ 6 ] figure and Drawing 7. Like the installation base part of above-mentioned Drawing 4, the installation base part 50 of the 6th the A figure distributes a fluid to each device, a fluid is sent out from each device, and it is useful to convey a fluid between each device. The installation base part 50 holds the sample pretreatment system 10 and the analysis apparatus 112, and has an accommodation hollow which coincides the regio oralis in a device with the circulation line of an installation base part. In particular, in the circulation line 54b of the circulation line 54c, the circulation line 54a corresponds with the exit 119 of the assay structured division 112 of an analysis apparatus in accordance with the inlet

section 14 of a sample pretreatment system in accordance with the exit 16 of a sample pretreatment system, and the entrance 114. the -- as shown inA [ 6 ] figure, while the circulation line 54a has the installation base part inlet section 56 and a fluid transfer relation, the circulation line 54c has the exit 57 and fluid transfer relations of an installation base part. An installation base part contains the screw style 58 which sends sample fluid to an analyzing system typically, for example, a pump. After the sperm phase with doubtful the fluid test sample, for example, whole blood, containing particles and the analysis target subject being included was supplied to the inlet section 56 of the installation base part 50, The pump 58 operates, a sample is sent to the separator 18, and the sample fluid in which the particle ingredient decreased substantially, for example, sperm, is provided. The sample fluid whose particle living thing was lost substantially is sent to the assay structured division 112 from the device 10 via the circulation line 54B for an examination, for example, immunoassay.

[ in the reaction/detection area of an analysis apparatus ], combination of the resultant of the analysis target subject to a bond groups object itself, or an analysis target subject as indicated by the above-mentioned related application (for example, refer to U.S. Serial Number 877,702) referred to, It can be detected by many techniques including the pressure or the electric conductive surveillance of sample fluid in a device, or the optical detection system which is visual or passes a transparent cover with machinery. the [ for example, ] -- the reaction of the cementing material in the reaction region 117 of the analysis apparatus 112 shown inA [ 6 ] figure and an analysis target subject is detectable by supervising the pressure of the sample fluid in the specific field of the circulation passage of a meso scale. the two pressure sensors 59a and 59b which detect the circulation pressure of the fluid in which this frequents an each device via the regio oralis 14 and 119 -- the -- it is realizable within the combination of the analyzing system installation base part ofA [ 6 ] figure. While assay is performed, particles condense, or a molecule carries out a mutual reaction chemically, a network is formed, and if the circulation or the viscous increase to which the sample fluid which passes through a reaction/detection area was restricted is invited, this change is detectable as pressure variation which shows a positive result. The pressure sensor of a meso scale and other electric or electromechanical sensors can be mass-produced by the already established art while they can be directly assembled on a silicon base. . [ , such as Angel, ], Scientific American, and No. 248:44-55 (1983).

Since it is used when performing an assay protocol which is different with other devices by this invention, other embodiments of an installation base part can be assembled. one of the embodiments of these -- the -- it is shown inB [ 6 ] figure, this shows the sectional view of an analyzing system, and it is arranged in the accommodation hollow 72 provided in the installation base part 70, and comprises analysis apparatus 110' accumulated on sample pretreatment system 10'. If the test sample fluid containing particles is given to the entrance 74

of an installation base part, sample fluid will be sent to the device 10 by the screw style 75, for example, a pump, and the sample fluid in which the particle ingredient decreased substantially for analysis will be given to analysis apparatus 110'. Covering 116 of analysis apparatus 110' has crevice 114' wide opened to the atmosphere for exhaust air of a system. Arranging analysis apparatus 110' on the top of a pile permits optical detection via the transparent area of covering 116'.

Other figures of the analyzing system which consists of a sample pretreatment chip combined with the installation base part of an above-mentioned form and an analysis apparatus for polynucleotide amplification are shown in Drawing 7. The sectional view of the analyzing system of Drawing 7 shows the installation base part 90 which has an accommodation hollow where the sample pretreatment system 10 and polynucleotide amplification / assay structured division 122 have been arranged. The sending part 28 of the distribution channel 24b in the sample pretreatment system 10 has the inlet section 124 and fluid transfer relations of polynucleotide amplification / assay structured division 122 through the circulation line 92. The circulation line 93 is in agreement with the exit part 129 of an analysis apparatus, and an installation base part has the exit part 94 and a fluid transfer relation.

Polynucleotide will be introduced into the amplifying region 127 if polynucleotide is released from the cell component separated from the sample fluid in the sample pretreatment system 10 by contacting above-mentioned suitable separating mechanism. A reagent required for amplification is added to the amplifying region 127 via the inlet section 126, as shown in Drawing 5. A screw style (not shown), for example, a pump, is used for distributing the amplifying region 127 via the circulation line 92 in a polynucleotide sample.

An amplifying reagent can be similarly distributed to the amplifying region 127 via a different circulation line established in the installation base part or the analysis apparatus (not shown). The output of a polynucleotide reaction can be sent to the field 128 for detection by an above-mentioned method. Result output can be collected via the exit part 94 of an installation base part, when required.

The differential pressure along the passage of the flow of the test sample fluid which passed the devices 10 and 122 can be measured using the \*\* sensor 96 relevant to the pressure sensor (not shown) arranged in the installation base part or the device, in order to measure a pressure in the upstream point of the sending part 28 of the device 10.

The installation base part 90 can include heating/cooling element 95 which controls the temperature in a polynucleotide amplifying region, for example, an electric heater element, and a cooling element. On the other hand, an electric heater element (not shown) is also accumulable into the base of the analysis apparatus 122 with the electric element electrically connected so that it may be in agreement with electric contact in the installation base part of amplifying region 127 lower part. On the other hand, the installation base part can include the

laser or other sources of electromagnetic energy (not shown) which adjoin the heating method of an inside or the exterior, for example, the amplifying region of polynucleotide amplification / assay structured division 122, and are arranged. It can be used for controlling a heater element in order that the microprocessor in the installation base part 90 may give the temperature cycle in a polynucleotide amplifying region between the temperature for which it was suitable for dehybridization, for example, 94 \*\*, and the temperature for which it was suitable for annealing and a polymerization, for example, 65 \*\*. A thermo couple is electrically connected with an installation base part into the base surrounding an amplifying region so that it may permit that a microprocessor or other electric controllers detect and maintain the thermal excursion in a reaction chamber. In order for a cooling element (material electric products company ., Trenton, NJ), for example, small thermoelectricity heat pump, to adjust the temperature of an amplification chamber, it can be contained in an installation base part. In other embodiments, the temperature of a polynucleotide amplification chamber can be controlled by the timed laser pulse to which a reaction chamber points via the glass cover 109, and can be permitted to the temperature which needs continuation heating cooling of a sample for amplification cycles. The heat characteristic of silicon makes a quick heating cooling cycle possible.

the [ Drawing 4 and ] -- the [ A / 6 / figure and ] -- in all the embodiments of this invention shown in B [ 6 ] figure and Drawing 7, a pump is controllable by the microprocessor in an installation base part. The device shown in the figure described at the end by a case For example, the clamp mounted on the installation base part (not shown), for example, a device is held in friction to an accommodation hollow by making a device into a suitable size to the case of the device table side which meets by adhesion, or an accommodation hollow -- various methods containing \*\* -- the accommodation hollow of an installation base part -- or it certainly fixes mutually and can be held.

the -- the biological examination device which can be used combining the sample pretreatment system of this invention is shown in A [ 8 ] figure. The device 130 is assembled on the base 131 and the meso scale distribution channels 132A and 132B to which the base 131 equipped the both ends of the channel with the inlet section 133 by which detailed formation was carried out, and mixing / capture / detection chamber 135 of the central meso scale are formed. the -- as shown in A [ 8 ] figure, the cross section size of the chamber 135 is large as compared with it of the channels 132A and 132B.

Capture reagents, such as a substance combined especially with an analysis target subject, are [ in the chamber 135 ] static, or can be fixed to either of the movable support. For example, when movable support, such as a polymer particulate, is used, since the fixed reagent is shut up in the chamber 135, the size of particles should be chosen so that it may become large as compared with the cross section size of the distribution channels 132a and 132b. Thus, it can

fill up with the reagent fixed on the particle rigidity base material in the chamber 135 well via the inlet section 137.

The device of the form described here can be used in order to perform various immunoassay reactions. For example, un-antagonistic immunological measuring assay for decision of a carcinoembryonic antigen (CEA) can be performed by filling up the chamber 135 with mono-KURONARU, anti-CEA, and the antibody fixed to particle base materials, such as for example, a plastic bead. The test sample which should be analyzed for CEA drives out the fluid introduced with the reagent which was added since it was filled up with the chamber 135 next, and was fixed. then, the contents in the chamber 135 are enough -- time maintenance is carried out and an antigen-antibody is fully combined. Then, mono- KURONARU Anti-CEA antibody Horseradish Antibody-enzymes conjugate, such as peroxidase, is applied in a chamber, and the contents are held again. The solution of a color-enhancing base is added to the chamber 135 next, this washes the fixed reagent, and it is useful to drive out uncombined conjugate. Enough bases are held in a chamber, combine with a fixing reagent, and react to sign peroxidase. A chromophoric group's generation rate is proportional to the CEA concentration in a sample directly.

The device 130 can be used in order to perform antagonistic assay which becomes final and conclusive CHIROOKISHIN in a test sample. The chamber 135 is filled up with the fixing reagent which consists of an anti-thyroxine antibody combined with the surface of the plastic bead when performing this format. It is beforehand mixed with CHIROKISHI peroxidase conjugate, and the test sample which should be analyzed for a thyroxine is added in a chamber, and it drives out the fluid introduced with the fixing reagent while filling up in a chamber. next, the contents in a chamber are enough -- time maintenance is carried out and an antigen-antibody fully joins together. A buffer circulates the chamber 135 selectively and a fixing reagent is washed. Next, it is added to a color-enhancing base chamber, and an uncombined reagent is driven out while a fixing reagent is washed. Enough bases are held in a chamber and react to the sign peroxidase combined with the fixing reagent. A chromophoric group's generation is inversely proportional to the concentration of CHIROOKISHIN in a test sample.

The assay structured division of the 8th the A figure is constituted so that the fixing reagent within the channel 135 may be enclosed, but for the purpose of washing, a fluid can pour in a fixing reagent with a pump and the design can pass it.

The interest of two embodiments described at the end only being illustrated as a device of the 8th the A figure, as other devices can use it for performing various assay formats should be carried out.

the -- in order to carry out micro processing on the base 141 inB [ 8 ] figure, for example, to capture an analysis target subject by immunological capture, the analysis apparatus 140 which

has the inlet section 143 which has the chamber 145 and a fluid transfer relation is shown. This device is applied in order to perform enzyme immunology assay. For the purpose, a device has the independent chamber 147 and this builds in the binding material for making the chromophoric group generated by the reaction of the marker enzyme on a suitable base capture and condense. For example, a protein-analysis subject can be become final and conclusive using "sandwiches" assay art, and an analysis target subject is captured in the chamber 145 in that case by the antibody which is fixed in a chamber and combined with a specific analysis target subject. The captured analysis target subject is identified by the antibody combined with the enzyme-labelled antibody conjugate which consists of alkaline phosphatase, and especially a protein-analysis subject. Fluorescein phosphate is introduced in the chamber 145 as a color-enhancing base for marker enzyme. The fluorescein captured by the anti fluorescein antibody which alkaline phosphatase acted on the base and was fixed in the chamber 147 is generated. If hydrophobic environment is formed in the chamber 147 with the material which adhered for example, to the structured division wall surface, the trapping agent, the reaction mixing ingredient, for example, a surface-active agent, or the colloid particle formation agent will improve the fluorescence signal from joint fluorescein. Since it performs within the chamber 147 or a chromophoric group is detected in other devices, a chromophoric group's detection can be removed from a device via the exit part 149. It can be chosen with the binding material used in order that other bases, such as 4 nitro FENIRU phosphate or 4 methylumbelliferone phosphate, may capture dephosphorization output, when performing this decision.

Other embodiments of the biological examination device which can be used when carrying out this invention are shown in Drawing 9. The detailed assembly of the regio oralis 152a-152e, the distribution channels 154a-154g, the reaction chambers 156a and 156b, and the capture/detection chamber 158 is carried out at the base 151 of the device 150. The reaction chambers 156a and 156b include a crookedness meso scale channel respectively. The path length of a crookedness channel can be designed so that mixing of a sample reagent and the timing of addition may be in agreement. The device of this form can be used combining the regio oralis in a device, and the installation base part which has the regio oralis in agreement, The installation base part can distribute and receive the fluid from the circulation system of a device, and can detect optically the positive or quantitative result in the chamber 158 selectively. The cholesterol ingredient of a sample can be become final and conclusive in one use of a device. Cholesterol S TARAZE is supplied via the inlet section 152a, and a buffer and a sample are respectively added via the inlet sections 152b and 152c. Next, a mixture is sent to mixing / reaction chamber 156a crooked through the channel 154d. The time of mixing and a reaction can be beforehand set up by carrying out micro processing of the crookedness channel to suitable length, and controlling the rate of flow. Cholesterol oxidase is added via the



regio oralis 152d, it is sent to the crookedness channel 156b through the channel 154g, and good mixing and reaction of the timing between cholesterol oxidase and the fluid within the channel 156a occur there. It can be provided in order that the same heating method as \*\*\*\* may hold a device more than 37 \*\* or it. A color-enhancing base is introduced into 153e via a distribution channel (not shown) for detection. It is optically detectable, when it is positive, or observing the detection chamber 158 via the optical window arranged on a chamber as a result of being quantitative for example. The capable fixed joint half agent which captures the output of an enzyme reaction to the detection chamber 158, therefore promotes detection can be provided. This device is applicable to the range of a clinical enzyme reaction or other reactions.

the -- according to the embodiment of \*\* shown inB [ 9 ] figure, capture of the identified fluorescence analysis target subject takes place within the chamber 158a containing the specific binding material combined so that an analysis target subject and an analysis target subject, and a release are possible. The released identified fluorescence analysis target subject is captured within the chamber 158b for detection.

the -- it is shown inC [ 9 ] figure -- in the embodiment of others [ pan ], a circulation way out makes a smaller cross-section area as compared with the channel 154e, and 154 f of distribution channels can be contracted so that the flow of the test fluid to pass may be restricted in a device by this. the -- as shown inC [ 9 ] figure, the channel 154f has a small size by each analysis channel, and comprises a pattern of the parallel circulation passage which gives a circulation passage narrow as a result. This device is applicable to execution of various condensation assays, and is detected based on the flow to which the sample which passes the branching portion 159 whose phenomena of particle derivation condensation or complex compound derivation condensation are 154f of distribution channels was restricted.

the --A [ 10 ] figure shows roughly the meso scale analysis apparatus 170 designed in order to perform various joint assay protocols. This device can become final and conclusive the range of an analysis target subject based on a little samples and a small amount of measured reagents, The identified output which should be detected is generated in a device, as a result, all the sample, unreacted reagent, and resultant are shut up in a device, and remain, and it is discarded after that.

this device -- the -- it can be used combining the installation base part (not shown) of the general form of having been explained with reference toA [ 6 ] figure. This device has the pump and valve which work together in order to distribute a circulation line and a sample, a reagent, a washing solution, and its prototype to a device while having an accommodation hollow holding a device. A temperature control and a sensor means, the pressure sensor that promotes detection of an analysis target subject and/or an electrical connector, an optical detecting means, signal amplification, and a measuring means are included in an installation

base part so that all may be explained here. This combination contains a means to memorize by presenting of the sequence of the whole device and a control element, and measurement information and an installation base part carrying out microprocessor \*\*, and being connected with an external computer.

As for this device, micro processing of the range of 0.01-100microL and the circulation passage constituted so that the total volume from about 0.5microL to about 50microL may be given preferably is carried out as mentioned above.

A little test sample fluids are introduced into the inlet section 171 when using it. This test sample fluid can be beforehand filtered by passing the sample pretreatment system of this invention, before being introduced into the inlet section 171. On the other hand, this sample fluid can also be filtered after being introduced in the device 170. Inner filtration is efficiently realizable by crossing circulation filtration art. the -- the circulation passage 172 through which sample fluid passes first after being introduced into the inlet section 171, as shown in 10B, It is preferred that it is divided into the two adjoining V character-like channels 172a and 172b, and is separated by the barrier 172 of a longitudinal direction, and this is formed with a substrate material (however, it will be made some of cover plates or sheets, and hung from there). the barrier 173 -- covering of a device -- the -- as shown inC [ 10 ] figure, at least one circulation circulation space is formed, and this permits that a fluid circulates, but it is a size sufficiently small although circulation of the particle ingredient of a fluid sample, for example, a cell, is prevented. The barrier 173 is arranged so that sample fluid may be directly supplied to the circulation passage 172a indirectly at the circulation passage 172b, and as compared with the sample with which the fluid which passes through the inside of the circulation passage 172b was introduced into the inlet section 171 and which is not filtered beforehand, the particle ingredient is decreasing substantially.

The circulation passage 172 so that a comparatively big cross section size may be branched from a comparatively small cross section size in the downstream of an inlet section, Or it has the barrier 173 which is provided with the wall surface which gathers a comparatively big cross section size and a comparatively small cross section size in the downstream of an inlet section, and is arranged almost in parallel with the wall surface of at least one circulation passage, and can be formed. It promotes that this design gives a nonlinear flow to sample fluid, and removes particles from the circulation circulation space 174.

When a test sample fluid is filtered depending on a way outside the device 170, an above-mentioned internal filter is made as it is unnecessary. On the other hand, the sample fluid by which inner filtration was carried out bypasses the direct, therefore circulation passage 172 via the inlet section 175, and can be introduced in a device. When required, it can be introduced via the regio oralis 175 for pretreatment of the sample fluid in which the buffer was diluted. The excess buffers can be collected by the exit part 176.

the quality of particulates captured at the circulation passage 172a -- the -- as shown inB [ 10 ] figure, it is sent to the exit part 176.

The filtration materials of the circulation passage 172b are sent in the circulation passage 177 set as the suitable size so that it may next function as a measuring chamber, and the predetermined amount of samples is given for analysis. Probably, this predetermined amount of samples is usually an about 1microL grade. In order to promote measuring the desired quantity of the sample fluid in a device to the device 170 for analysis, the scale 178 can be formed by etching etc. By making it possible to introduce the regular amount of samples in the device 170, the circulation passage 177 will permit measuring of an analysis target subject again.

Are employable in the device 170 in order to convey the sample fluid in which the suitable screw style (not shown) incorporated in the designed installation base part was measured to the circulation passage 179 so that it may be used with this device, Selectively, this is provided in order to mix sample fluid with the primary reagent used when performing joint assay. It is useful that the mixing chamber which starts in the device 1709 is included, when attaining the quick and perfect reaction between an analysis target subject and a primary reagent.

The pump of versatility [ style / suitable / for conveying sample fluid, a reagent, a buffer, and its prototype to the circulation system of the device 170 / screw ], For example, other pump means publicly known to a detailed mechanical pump, a diaphragm pump, a syringe pump, a capacity closing pump, the derivation style according to electrochemical revolution of an endosmosis pressure derivation style and gas similarly, and a person skilled in the art are included.

A primary reagent can be directly distributed to the circulation passage 179 in a device via the inlet section 180. After this primary reagent is introduced into the circulation passage 179, it comes to be simultaneously mixed with the measured sample fluid continuously or fundamentally. optimum dose of fly MARI reagents are obtained exit part 181, are passed, and can be sent out from a circulation system.

The supply source of a primary reagent can be selectively used as the internal storing chamber which can be provided in the device 170. the [ on the other hand, / above-mentioned / a primary reagent ] -- it can be distributed in a device from the reservoir in installation base parts used with an examination device, such as an installation base part explained inA [ 6 ] figure, or other supply sources of the device exterior. This primary reagent is storable as a solution, gel, or neatness with the gestalt of desiccation or freeze-drying, or other suitable gestalten. For example, it can be freeze-dried at the place in the circulation passage 179, and a primary reagent can be used in order that the test sample fluid or the suitable solvent introduced via the inlet section 180 in that case may dissolve a fly MARI reagent. On the other hand, a test sample fluid or a solvent is guided at the reservoir chamber (not shown) of the

method of the outside of the circulation system shown in Drawing 10 from the distribution channel 179 by a fluid transportation means as mentioned above, and can also dissolve a primary reagent. The dissolution of the primary reagent which the heating method or the agitating means (not shown) was adopted as the reservoir chamber, and was stored there can also be promoted.

The primary reaction mixture which consists of sample fluid and a dissolved primary reagent can also be made to react within the distribution channel 179 which has again a structural element which promotes a turbulent flow as mentioned above. It can be provided in order that an agitating means or other means may secure sufficient mixing of a fly MARI reaction mixture. This primary reaction mixture comes to be held in sufficient time distribution channel 179 until a desired reaction is completed.

A means to prepare the temperature in the distribution channel 179 which was explained in Drawing 7 can be used in order to raise a primary reaction situation selectively. It is provided when the means in the distribution channel 179 which carries out temperature detection is required. A temperature detecting means is connectable with the microprocessor or the similar device which controls the overall function of a system to relate the holding time of the primary reaction mixture in the circulation passage 179, and the detected temperature mutually operational. After a reaction is completed, all or some of primary reaction mixture can be sent to the capturing area 182 and the detection area 183 by an above-mentioned pump or other screw styles, and 1, two or more ultimate constituents, or the primary resultant of sample fluid is supervised there, and/or it is detected. On the other hand, the output of a secondary response relevant to existence of the analysis target subject in sample fluid or concentration, and mutual in the existence or concentration is also employable as decision of an analysis target subject.

These are detection art used in relation to the device 170 in which it is generally used, when performing joint assay. The change in the characteristic of the analysis target subject which will be invited by the chemical change between chemical test;, for example, a primary reaction, which is performed with the examination reagent of others [ these ] if it says simply, For example, the shift in an absorbance or wavelength, change of fluorescein polarization, change in a fluorescein Stokes shift, And how to use the spectroscope which detects the change which can be set similar; the specific measurement by the art of measurement of the electrochemical behavior of condensation; measured by a microscope, an image analyzer, or the similar procedure and the primary mixture which reacted, for example, an ammeter, and a potentiometer/voltmeter is included.

The capturing area determined by the circulation passage 182 is provided about execution of the secondary response for decision of an analysis target subject, All or some of primary mixture which reacted by the fluid transportation means of an above-mentioned form is sent

into a capturing area, in a capturing area, 1 or two or more ingredients of the output in a primary reaction mixture can be captured by the combination to the surface, and detection and/or measuring are performed as a result. A capture reagent is fixable on the particles which exist on the wall surface of the circulation passage 182, and in the circulation passage 182, the surface of a bead, or both.

It consists of a plastic, latex, silica, or a suitable support sample including an electromagnetic element, and in order to fill up the circulation passage 182 with a solid phase capture reagent with the capability to combine especially with the output of fly MARI reaction mixing, beforehand, the inlet section or the filling hole is provided. A particle capture reagent can be eventually poured into the circulation passage 182 with the gestalt of the wet slurry dried or freeze-dried or desiccation either. In the case of which, the restoration to a circulation passage can be selectively assisted by the oscillating means or other means. The surface coating of the avidin which the movable solid phase body of a capture reagent consists of the particles or bead which has a size from 10 nanometers to 10 microns, it is BIOJIN-ized or especially a conjugate antibody combines, SUTOREPU avidin, or other bases is made.

Passage of a fluid is permitted, while the structural elements 189a and 189b or other means of restricting circulation are formed in the circulation passage 182 and a capture reagent is shut up in the circulation passage 182. a particle capture reagent -- the -- asA [ 8 ] figure was explained, it can be shut up in the circulation passage 182.

Only sufficient time when a primary reaction mixture runs to the grade that a reaction with a capture reagent is publicly known to end fundamentally preferably comes to remain in the circulation passage 182. As the circulation passage 179 was explained above, the temperature in the circulation passage 182 is prepared and a means to detect can be formed selectively. As for the output in which the primary reaction mixture was captured, being washed before advance of a secondary response is preferred.

The reagent solution for a secondary response is directly distributed to the device 170 via the inlet section 185. The excess secondary reagent is removed from a circulation system via the exit part 186 or 187. On the other hand, the reagent for a secondary response is used within the reservoir chamber of some other convenient supply sources of the installation base part used with the device 170 and a device, or the device exterior while it is held before the dissolution. It is combined with a screw style operational, and 1 or two or more circulation lines are provided so that it may convey towards the above-mentioned secondary reservoir chamber which the reagent stored from the inlet section in the solvent is dissolved selectively, and generates a secondary-response solution, while being appropriately connected with the circulation passage in the device 170. The reagent for a secondary response contains the substance with which washing of the primary resultant united when it dissolved in the enzyme substrate which specifies the enzyme which carries out conjugate to the captured primary

resultant, and a secondary-response solution is assisted.

A secondary response occurs preferably at the circulation passage 182, and it reacts to the primary resultant which the secondary-response solution captured. secondary-response output is based on light absorption characteristics, a fluorescent characteristic, and the phosphorescence characteristic -- a detectable molecule or ion; -- it is a substance chosen from the group of a molecule detectable with molecule or ion; the nuclear magnetic resonance characteristic, or paramagnetism detectable by the radiation property, or ion;. The output of a secondary response is amplified by the publicly known procedure in the technical field concerned, and can raise the detection. For example, an enzyme amplification reaction is adopted and Frollo Ole generated from the non-fluorescence precursor in a secondary-response solution is released.

the generation result thing after a secondary response is completed -- the inside of the circulation passage 182 -- or in the detection area 183, it is detected and measured in the detector of the device 170 exterior as a result.

While the desirable cross section sizes of the circulation passages 177 and 183 which cross the circulation passage of sample fluid are a width of about 100 micrometers, and a depth of 70 micrometers, the desirable cross section sizes of the circulation passages 179 and 182 which cross the circulation passage of sample fluid are about 400 micrometers in width, and 70 micrometers in depth. These sizes exist in a meso scale as mentioned above.

Various joint assay protocols which include the immunological measuring (sandwiches) assay and the antagonistic immunoassay which adopted both poly KURONARU and a monoclonal antibody for the purpose of capture and detection of an analysis target subject can be performed within the device 170. One gestalt of a detection antibody contains the conjugate sign which is Frollo Ole who can detect as a joint half agent, after being captured on solid phase. Other gestalten of a detection antibody contain the conjugate sign which is Frollo Ole detected, after being released from a primary resultant. Other gestalten of a detection antibody contain conjugate enzyme half agents, such as horseradish peroxidase or alkaline HOSUFAZE.

In a suitable case to remove the substance in which it interferes potentially from the device 170, a washing process is performed.

The excess sample fluid, reagent, washing solution, and prototype are driven out of various circulation passages and structural elements in the desirable single abandonment container of sufficient capacity in the device 170, and are accommodated safely because of abandonment of all the sample fluid and resultants while being combined.

the --A [ 11 ] figure becomes final and conclusive existence of the intracellular polynucleotide in the fluid sample of biological cell content, and shows roughly the analysis apparatus 191 used in order to perform assay of a nucleotide chain specific next. On the base 192, micro

processing of the circulation passages 194a-194c of a meso scale is carried out, and this has a polynucleotide amplification chamber which has the cellular segregation chamber 196a, the cell elution chamber 196b, the filter element 197, and the portions 198a and 198b, and the detection area 199. The fluid entrance parts 193a-193d are formed in the meso scale circulation system. this device -- the -- it can be used combining an installation base part which was explained by being attached toA [ 6 ] figure.

First, while the valve in an above-mentioned installation base part closes the regio oralis 193c and 193d, it acts so that the regio oralis 193a and 193b may be opened. For example, the sample containing the mixed cell sent from the sample pretreatment system is guided by suitable screw styles, such as a pump (not shown), at the sample inlet section 193a, and is sent to the separation chamber 196a through the distribution channel 194a. The chamber 196a contains the joint half agent fixed on the chamber wall surface, and combines this with the molecule surface on the cell of the form of the request in a sample selectively. The remaining cell component comes out of a base via the regio oralis 193b. After combining with the cell of a desired form within the chamber 196a, in order to wash and to secure separation of a target cell, a flow is continued with a buffer. Next, the regio oralis 193b is closed and the regio oralis 193c is opened. In order to remove the cell fixed to the next from the chamber 196a, it is fully increased by the flow. The film which a flow is continued and penetrates the projected part 195 in the chamber 196b for a cell is passed, a cell is cleft, and intracellular substances are made to release. The flow of a sample is continued until it passes the filter 197, a big cell membrane and fragment are removed, and filtration materials are sent to the meso scale chamber portion 198a connected to the PCR chamber portion 198b by the distribution channel 194b. Sign polymerase required for PCR assay, a primer, and other reagents permit mixing with an intracellular solubility ingredient and an PCR reagent from the cell secondary following group added and separated into the portion 198b from the supply source (not shown) via the regio oralis 193c next. (securing that the quality of a reaction mixture does not evaporate -- the loss from a device -- it should prevent), if the regio oralis is closed, Screw styles, such as a pump (not shown), apply driving force to the regio oralis 193b, and the distribution channel 194b between the regio oralis 198a and the regio oralis 198b which were respectively set as 94 \*\* and 65 \*\* is made to circulate through an PCR sample and a reagent, The dissolution of two or more polynucleotides and the cycle of a polymerization are performed, and amplification of the polynucleotide of a sample is permitted. In front of the following down stream processing, the regio oralis 193c is closed and the regio oralis 193d is opened. the polynucleotide which the same impelling force was separated from the cell population next, and was amplified -- the -- it is used for showing the detection area 199 which makes the gestalt of the pattern of a distribution channel which explainedC [ 9 ] figure. The flow in the restricted field which decreased is useful to show existence of the output of the amplified polynucleotide positively,

and can be optically detected via the glass cover which covered the detection area 199 and has been arranged. On the other hand, the output of the amplified polynucleotide is parkin. It is directly detectable from Elmer within a reaction chamber using reagents which were developed for the above-mentioned purpose and which are marketed commercially, such as the "Taq Man" (registered trademark) reagent marketed. The amplified polynucleotide is also detectable in the exterior of a device using various publicly known methods, for example, the electrophoresis method within agarose gel under existence of an ethidium bromide, by the technical field concerned.

the -- when carrying out this invention inB [ 11 ] figure, other embodiments of the useful analysis apparatus are shown in it. This device 210 contains the base 214 in which detailed formation of the meso scale polynucleotide amplifying region 222A was carried out. This device can be used combining the installation base part 90 shown in Drawing 7, and a similar installation base part. The circulation passage where this installation base part was connected to the regio oralis 216A, 216B, 216C, and 216D in the device 210 is provided. This installation base part contains the valve which permits that the regio oralis 216A, 216B, 216C, and 216D is opened and closed mechanically. In one embodiment, the circulation system of a device can be maintained to the limit in fluid pressure, and the valve in an installation base part or the device itself can be used for guiding the flow of a fluid. The chamber 222A is heated and cooled by suitable temperature to give heating of the temperature of dehybridization required for PCR, annealing, and a polymerization. The temperature of a reaction region is controllable as Drawing 7 explained.

the -- the circulation system shown inB [ 11 ] figure removes the ingredient which can filter sample fluid with the tendency acting as an analytic obstacle including the filter element 224 of a general form of being explained here.

In operation, the sample containing polymerase enzyme and other reagents required for PCR is distributed to the reaction chamber 222A via the inlet section 216A. After the PCR reaction cycle which will be used in order to carry out the temperature change of the reaction chamber between the temperature to which the heater element fitted dehybridization next, and a temperature suitable for annealing and a polymerization if the regio oralis is closed is completed, The regio oralis 216B and the regio oralis 216D are opened, and it sends to the detection area 222B containing the probe of the polynucleotide fixed to the bead 292 in the contents of the chamber 222A, for example. The positive assay for polynucleotide is shown by condensation of the bead in a detection area.

Although polynucleotide amplification is explained by especially here with reference to PCR, it will be understood by the person skilled in the art of the technical field concerned that the device and system of this invention can be effectively used for other various polynucleotide amplification reactions equally. Other starting reactions are thermally [ polymerase chain



reaction etc. ] subordinate, or can be performed at those single temperature (for example, amplification (NASBA) based on a nucleic acid chain). The extensive various amplifying reagents and enzymes containing a DNA ligase, T7 RNA polymerase and/or reverse transcriptase, and others are employable as this reaction. The conversion of polynucleotide can be attained by the technique of having combined a publicly known chemical method, the physical means themselves, or these and a temperature change. Although the polynucleotide amplification reaction performed in the device of this invention is not limited, A technique based on amplification of the signal which adheres to : (1) independence type chain duplicate (3SR) and spiral substitution amplification (SAD); (2) target polynucleotide in which the following are contained, For example, "branching chain"; [ DNA amplification (Tiron company, Emery building, CA) ] (3) amplification or a technique based on probe DNA, For example, a technique based on a ligase chain reaction (LCR) and QB replicase amplification (QBR); (4) transfer, ligation activated transcription (NASBA); and other amplification techniques of (5) versatility, for example, a restoration chain reaction, (RCR), and a repetition probe reaction (CPR) (the technique of these, and the outline of sale on the commerce -- the Genesys group.) Montclair, NJ; refer to the Genesys report and DX, three No. 4, and 2-7 pages of 2 month 1994.

the [ to which it this case-applied, simultaneously applied for the sample pretreatment system of this invention / U.S. patent application ] -- it can be used in relation to the meso scale polynucleotide amplifying device which are 08/308,199 (representative No.G1158) of the themes. The whole indication of the application explained at the end is clarified by being referred to here.

If it says simply, it is related with the meso scale device for amplification of the preselected polynucleotide in the sample fluid of the patent application explained at the end. The base by which micro processing was carried out to this device including the polynucleotide amplification chamber which has at least one cross section size of about 0.1-1000 micrometers is provided. In order to introduce a sample into a chamber, to exhaust a chamber to this device, when required and to remove output or a tail to it from a device selectively, at least one regio oralis which has a reaction chamber and a fluid transfer relation is contained in it. The reagent required for amplification of the preselected polynucleotide is formed in the reaction chamber. The means for amplifying the polynucleotide which prepared the contents of the reaction chamber thermally and was chosen beforehand is contained in this device. As for a reaction chamber, in order to promote thermal adjustment, it is preferred that it is formed that a high volume surface ratio is also. When required for an amplification reaction chamber, the mixture which controls that an amplification reaction is checked with the substance which constitutes the wall surface of a reaction chamber is contained.

the [ Drawing 4 and ] -- the [ A / 6 / figure and ] -- the sample of the quantity by which the

installation base parts 30, 50, 70, and 90 respectively shown inB [ 6 ] figure and Drawing 7 were measured. A reagent, a buffer, and a prototype are distributed and it can be used for performing adding a sample or other fluids with sufficient timing to a device in relation to execution of an above-mentioned analytical protocol simultaneously. When a microprocessor is contained in these cases in an installation base part, it can be used for helping to collect the data for one or a series of analysis.

Although decision of the analysis target subject was explained by especially the above with reference to whole blood as sample fluid, To the analysis target subject of this sample, for example, whole blood containing an anticoagulant, diluted whole blood, The eluted whole blood, the whole blood containing an assay reagent, a blood serum, plasma, urine, sperm, cerebrospinal fluid, What exists in the test sample or sample which contains other biological fluid of \*\*, such as other useful sample fluid, in a device and \*\*\*\* analysis for systems being conducted [ which is described amniotic liquid, a penetrant remover, an organization extract, cell suspension, and here ], and which changed from the first thing is contained.

the -- the [A / 12 / figure thru/or ] -- various kinds of embodiments of other of the separator of the circulation which can be arranged in the circulation passage of the device explained here and which micro processing was carried out and was restricted are shown inD [ 12 ] figure.

The separator of the 12th the A figure forms a series of circulation circulation spaces 254a and 254b which made the gestalt of two or more partitions 251, projected from the opposite surfaces 252a and 252b of the channel 253, and aligned in accordance with the channel at the longitudinal direction. 1 or two or more Nakama partitions 255 which project from the bottom of the channel 250 have stood up as the barrier or baffle in the circulation passage which adjoined 1 or the downstream confrontation portion of two or more partitions 251, has been arranged and was provided by the circulation passage 253 which aligned.

The sample fluid which is comparatively high-speed and passes through the comparatively narrow circulation passages 254a and 254b is distributed in the space between parallel partitions.

On the other hand, speed is slowed down and it is in the tendency which moves in the inside of the DETTO space of the corner of this space.

Next, sample fluid's passage of the inside of the space of the following internal continuation partition will suspend the quality of particulates respectively in dead volume. Therefore, the quality of particulates is cumulatively suspended by each passage in a subsequent internal partition space, and if sample fluid passes a partition and flows downstream, it will come to be purified gradually. If a sufficient number of partitions are provided in a series, it becomes possible to decrease the concentration of particles gradually, and the efficiency can be set up beforehand. It can assist guiding sample fluid in a DETTO volume field with the baffle 255.

the -- it is formed inC [ 12 ] figure with the barrier 257, and the separator structure of the dam

form which projects from the bottom 256 of the channel 250 is shown.

the -- the [C / 12 / figure and ] -- the separator structure shown in D [ 12 ] figure uses the character of particles, and is dropped under the influence of gravity. This is useful to especially analysis of whole blood by performing the sedimentation of red corpuscles. After sample fluid passes at the high speed on the barrier 257, it slows down immediately. The quality of particulates which descended towards the floor line of the channel 250 encounters a lower speed of support, and a possibility of exceeding the barrier which follows the next according to a vortex decreases. Particulate concentration decreases gradually and the sample fluid purified gradually can be generated by the passage of the sample fluid exceeding these barriers of a series of. It assists that 1 or two or more tongue-shaped pieces which were hung from the cover plate 260 guide sample fluid caudad.

The following example is provided in order to explain this invention to details more. These examples mean that it is illustration and do not limit an invention.

an example 1 plastic silicon compound examination device is assembled by covering the silicon base 131 and attaching plastic (3M transparent sheet) covering -- the, as roughly shown in A [ 8 ] figure, Micro processing of the distribution channels 132a and 132b is carried out, and micro processing of the inlet section 133 is carried out to the both ends of the channel. (to 0.05M sodium bicarbonate and pH 9.6 inside) Anti-A diluted solution and 1:10 diluted solution of the A blood group to salts were introduced into the inlet section 133 of the opposite end of the channels 132a and 132b via the syringe using the electrode holder. The solution was mixed together by the central chamber 135, and condensation was observed through the plastic hinged cover by the optical microscope. The result is shown in the following table.

Anti-A Degree of dilution	The condensation Gamma within a channel
Kit 1:20 +Gamma Murine. Mono 1:20 +Gamma Human. Dilutin 1:5+	example 2 mouse IgG solution +Immucor Affinity pure 1:100 (0.05M sodium bicarbonate.) +Immucor Ascites 1:100 To pH 9.6 inside, 50microg/mL (SIGMA Cat.No ** 1-5381),

The channel 132a of other examination devices prepared like explanation of 1:20 diluted solution of the goat anti-mouse IgG(H&L)-fluorescein carboxylate bead (Polyscience) to an PBS buffer in Example 1, The electrode holder was used for the inlet section of the opposite end of 132b, and it was introduced via the syringe. The solution was mixed together in the reaction / detection area 135, and condensation was observed through the plastic hinged cover by the optical microscope.

Although the specific embodiment of this invention was described above and/or it was illustrated, probably, other various embodiments will be clear to the person skilled in the art of the technical field concerned from above-mentioned explanation. Therefore, this invention is not limited to the specific embodiment which was described and/or was illustrated, but various modification and improvement are possible for it to written-to claim within the limits.

[Translation done.]

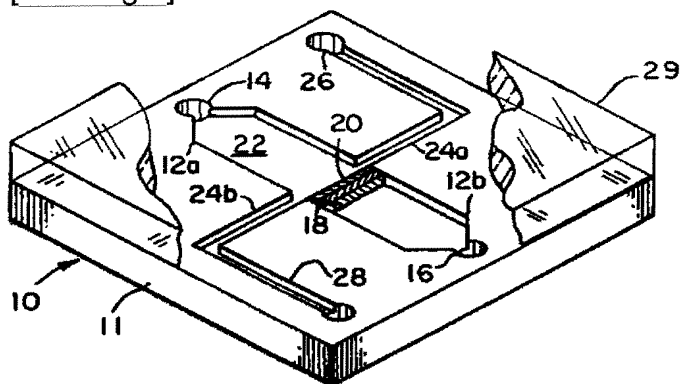
## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

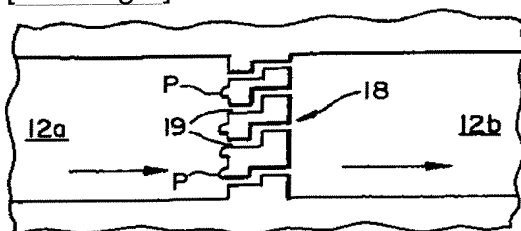
- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

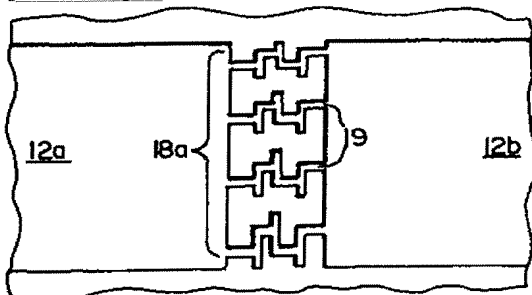
[Drawing 1]



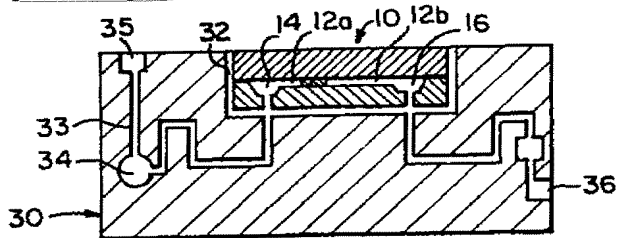
[Drawing 2]



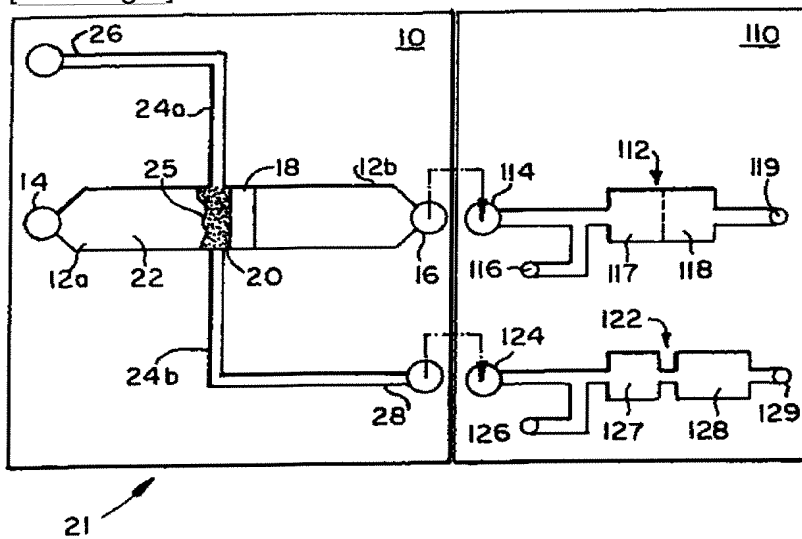
[Drawing 3]



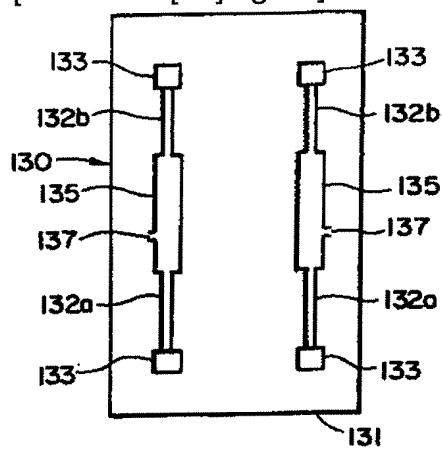
[Drawing 4]



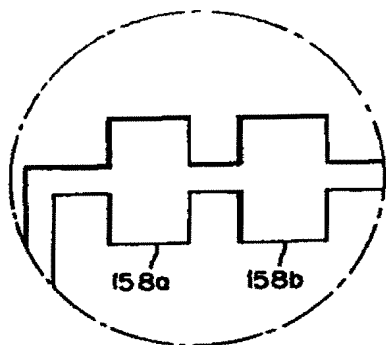
[Drawing 5]



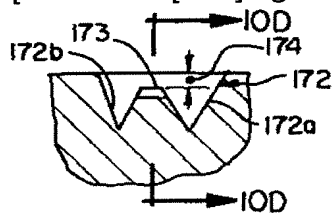
[ -- the --A [ 8 ] figure]



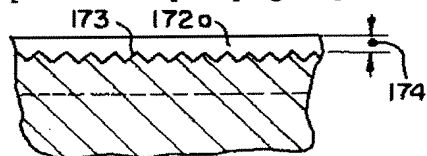
[ -- the --B [ 9 ] figure]



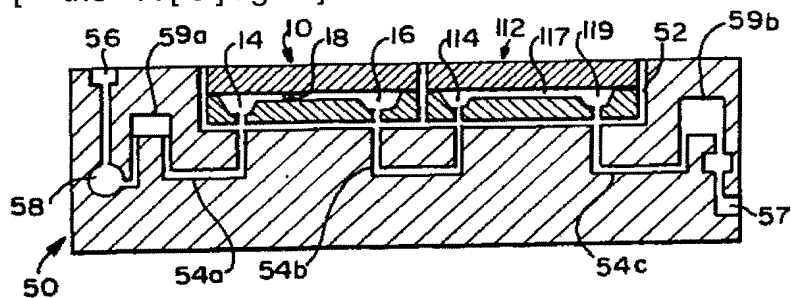
[ -- the --C [ 10 ] figure]



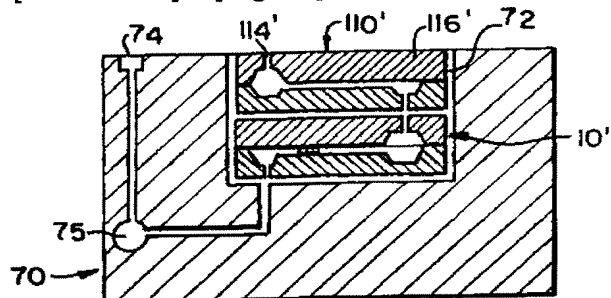
[ -- the --D [ 10 ] figure]



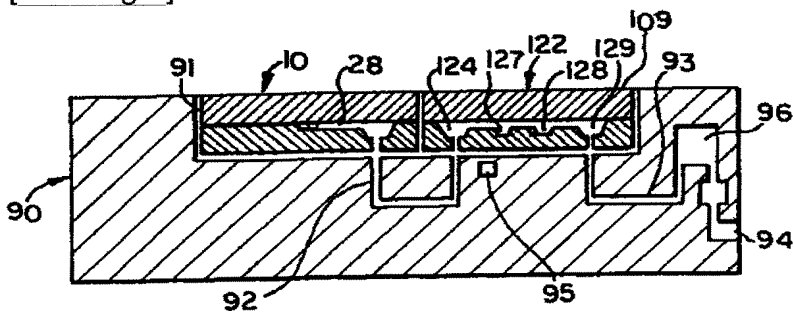
[ -- the --A [ 6 ] figure]



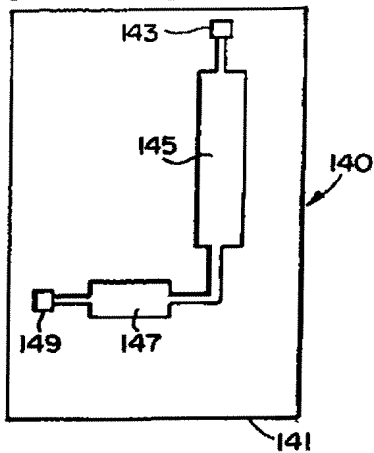
[ -- the --B [ 6 ] figure]



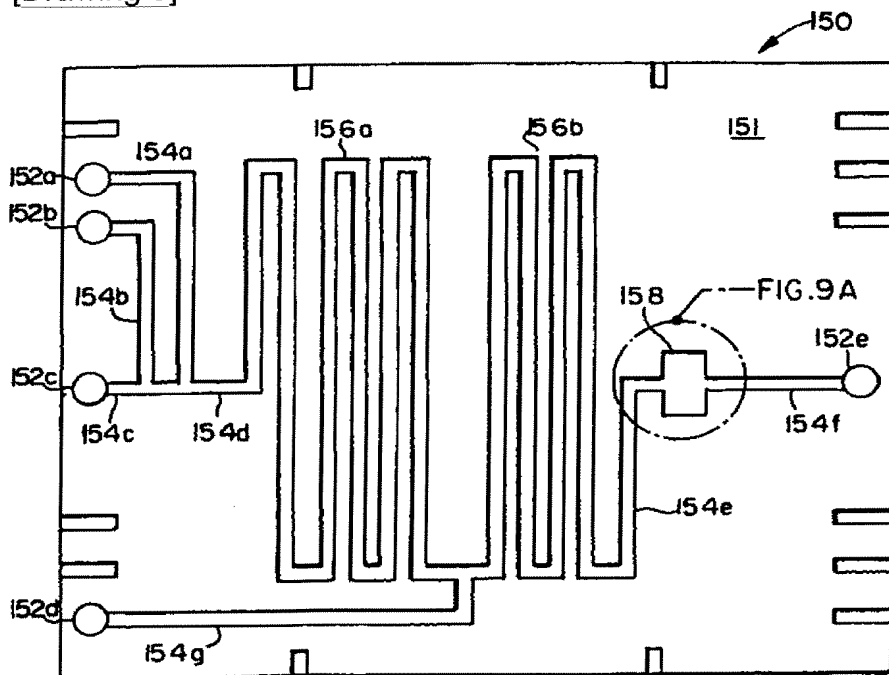
[Drawing 7]



[ -- the --B [ 8 ] figure]

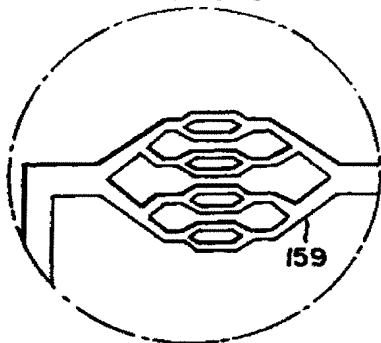


[Drawing 9]

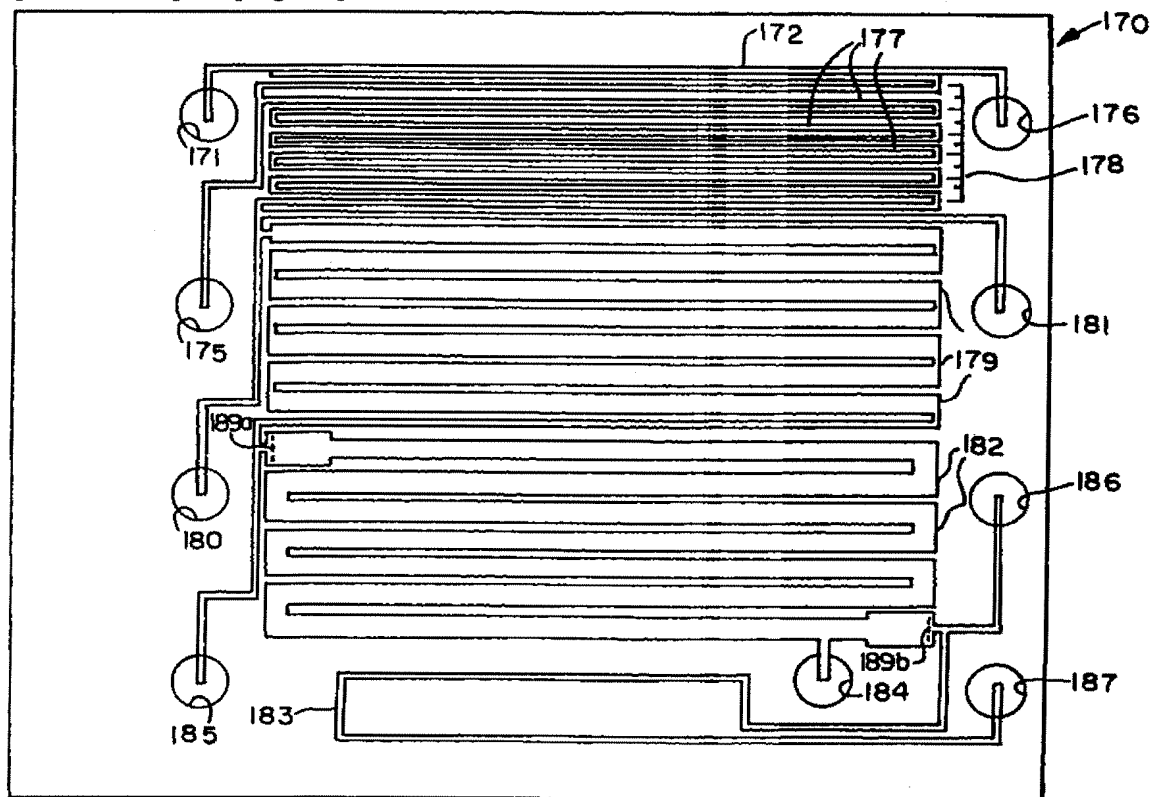




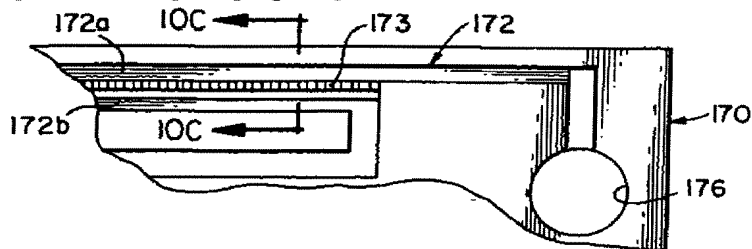
[ -- the --C [ 9 ] figure]



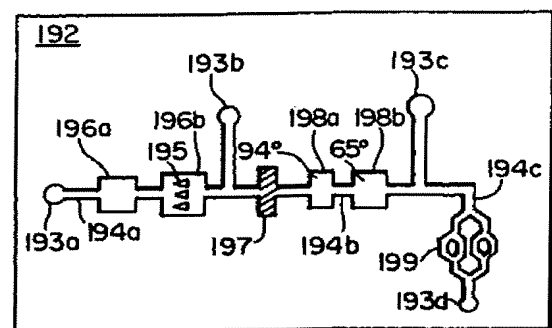
[ -- the --A [ 10 ] figure]



[ -- the --B [ 10 ] figure]

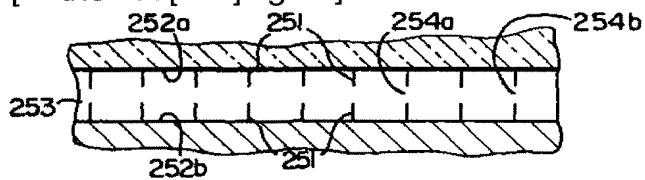


[ -- the --A [ 11 ] figure]

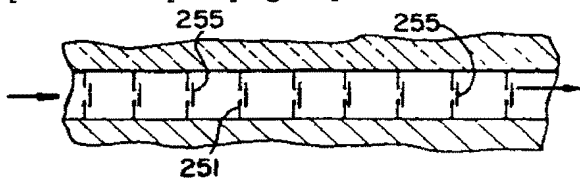


191

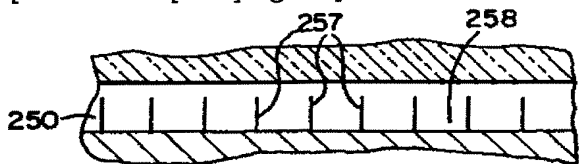
[ -- the --A [ 12 ] figure]



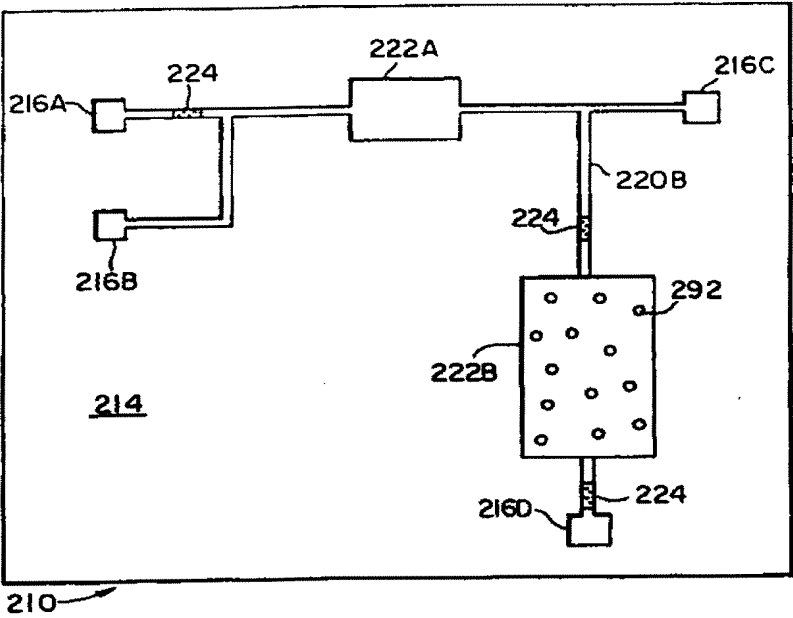
[ -- the --B [ 12 ] figure]



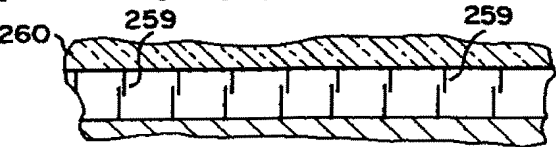
[ -- the --C [ 12 ] figure]



[ -- the --B [ 11 ] figure]



[ -- the --D [ 12 ] figure]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

# 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3220158号

(P 3 2 2 0 1 5 8)

(45) 発行日 平成13年10月22日 (2001. 10. 22)

(24) 登録日 平成13年 8 月10日 (2001. 8. 10)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup> 識別記号

G01N 33/48

B01D 35/02

B01L 11/00

C12M 1/00

C12Q 1/68

F I

G01N 33/48

B01L 11/00

C12M 1/00

C12Q 1/68

B01D 35/02

請求項の数25 (全20頁)

(21) 出願番号 特願平8-516296

(86) (22) 出願日 平成 7 年11月13日 (1995. 11. 13)

(65) 公表番号 特表平9-509498

(43) 公表日 平成 9 年 9 月22日 (1997. 9. 22)

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 5 / 1 4 8 2 5

(87) 国際公開番号 W O 9 6 / 1 4 9 3 4

(87) 国際公開日 平成 8 年 5 月23日 (1996. 5. 23)

審査請求日 平成11年 1 月 6 日 (1999. 1. 6)

(31) 優先権主張番号 3 3 8 , 3 6 9

(32) 優先日 平成 6 年11月14日 (1994. 11. 14)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 3 3 8 , 3 8 0

(32) 優先日 平成 6 年11月14日 (1994. 11. 14)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシ

ティ・オブ・ペンシルベニア

アメリカ合衆国19104ペンシルベニア州、

フィラデルフィア、スイート300、マー

ケット・ストリート 3700番

(72) 発明者 ワイルディング、ピーター

アメリカ合衆国19301ペンシルベニア州、

パオリ、ダービー・ロード 208番

(72) 発明者 クリッカ、ラリー・ジェイ

アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州、

バーウィン、ネイサン・ヘイル・ロード

886番

(74) 代理人 999999999

弁理士 青山 稔 (外 2 名)

審査官 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析対象物質の確定及び処理のためのメソ規模の試料前処理装置及びシステム

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分析すべき微粒子成分を含む試験サンプルの前処理用の装置であって、

サンプル入口部と、該入口部と流体伝達関係にある出口部とを有するサンプル流通路と、

前記入口部と出口部との間に配置され、かつ、前記微粒子成分が収集される分離領域を前記サンプル流通路に画成する上流対面部分を有するセパレータと、

前記分離領域と連通して、収集された微粒子成分を前記分離領域から送り出す流通チャンネルとからなり、

該チャンネルが、搬送流体を前記分離領域内へ、そして前記セパレータの上流対面部分を越えて案内する入口部分と、前記搬送流体を前記セパレータの上流対面部分を越えて前記分離領域外方に案内する送り出し部分とを有し、

2

また、前記流通通路と前記流通チャンネルの内の少なくとも1つの寸法諸元の少なくとも1つがメソ規模であることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のものであって、前記流通通路の寸法諸元の少なくとも1つがメソ規模であり、また、前記セパレータが前記流通通路内に流れを制限する流れ制限領域を含み、該流れ制限領域の寸法諸元の少なくとも1つが前記流通通路における最小メソ規模寸法よりも小さいメソ規模であると共に、前記試験サンプルから前記微粒子成分を分離するのに充分小さい少なくとも1つの通路部分によって形成されていることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 3】 請求項 2 に記載のものであって、前記少なくとも1つの通路部分が少なくとも一つの折曲げ部分を有して、前記通路部分の少なくとも一部分がこの折

曲げ部分において前記流通通路に対して直交延在していることよりなることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 4】請求項 1 から 3 までの何れか一項に記載のものであって、前記流通通路及び前記流通チャネルが剛性基板の表面に形成され、前記表面に取付けられたカバーによって覆われていることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 5】請求項 4 に記載のものであって、前記セパレータが、前記流通通路にあって、試験サンプルの前記流通通路に沿った流れを制限すべく前記基板から起立する少なくとも 1 つの突起部の形状であることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 6】請求項 4 または 5 に記載のものであって、前記カバーが透明であることよりなる試験サンプル前処理装置。

【請求項 7】請求項 1 から 6 までの何れか一項に記載のサンプル前処理装置と該装置と共に使用される取付け基部との組合せ装置であって、前記取付け基部が、前記装置のホルダーと、前記装置のサンプル入口部と内部接続された試験サンプル入口溝と、前記流通通路に沿って試験サンプルを移動させる推進機構を含むことよりなる組合せ装置。

【請求項 8】請求項 7 に記載のものであって、前記取付け基部がさらに前記試験サンプルの貯留器を含むことよりなる組合せ装置。

【請求項 9】請求項 7 に記載のものであって、前記取付け基部が、さらに前記流通チャネルの前記入口部分と内部接続された搬送流体入口溝と、搬送流体を前記流通チャネルに沿って移動させる推進機構とを含むことよりなる組合せ装置。

【請求項 10】請求項 9 に記載のものであって、前記取付け基部がさらに前記搬送流体の貯留器を含むことよりなる組合せ装置。

【請求項 11】請求項 1 から 6 までの何れか一項に記載のサンプル前処理装置と分析対象物の検出装置とからなる、流体サンプル内の分析対象物を確定するシステムであって、前記分析対象物の検出装置が、サンプル入口部が形成されている剛性基板と、前記入口部と流体伝達関係にあって、前記分析対象物と反応して前記分析対象物を確定しうる検出可能な生成物を生成する試薬を有する検出領域と、前記生成物を検出する検出器とを備えた流れシステムとからなり、前記サンプル前処理装置の流通通路の出口部が前記分析対象物の検出装置の前記サンプル入口部と連通してなる分析対象物確定システム。

【請求項 12】請求項 11 に記載のものであって、前記分析対象物の検出装置において、サンプル流通チャネルが前記入口部及び前記検出領域と内部接続され、前記検出領域及び前記サンプル流通チャネルの内の少なくとも 1 つの寸法諸元の少なくとも 1 つがメソ規模であることよりなる分析対象物確定システム。

【請求項 13】請求項 11 または 12 に記載のものであって、前記試薬が特に前記分析対象物に結合する結合物質であることよりなる分析対象物確定システム。

【請求項 14】請求項 13 に記載のものであって、前記分析対象物が抗原であり、前記結合物質が抗体であることよりなる分析対象物確定システム。

【請求項 15】請求項 13 に記載のものであって、前記分析対象物が配位子であり、前記結合物質が受容体であることよりなる分析対象物確定システム。

10 【請求項 16】請求項 13 に記載のものであって、前記分析対象物が所定連鎖の核酸分子であり、前記結合物質が前記分析対象物の連鎖に対して相補的又は同一源の連鎖を有する核酸分子であることよりなる分析対象物確定システム。

【請求項 17】請求項 11 に記載のものであって、細胞由来の所定ポリヌクレオチドの増幅反応の分析を行う分析装置をさらに含み、

前記分析装置が、サンプル入口部が形成されている剛性基板と流れシステムとで構成されており、

20 前記流れシステムが、ポリヌクレオチドを増幅する試薬を含む、前記入口部と流体伝達関係にあるポリヌクレオチド増幅領域と、前記サンプル前処理装置の流通チャネルの送り出し部分と前記細胞を溶離する前記ポリヌクレオチド増幅領域との間に臨む溶離手段とを備えてなり、前記分析装置のサンプル入口部と前記サンプル前処理装置の流通チャネルの送り出し部とは互いに流体伝達関係にあることよりなる分析対象物の確定システム。

【請求項 18】請求項 17 に記載のものであって、前記装置の入口部及び前記ポリヌクレオチド増幅領域と内部接続された、前記分析装置内のサンプル流通チャネルをさらに含み、前記ポリヌクレオチド増幅領域及びこれに接続されたサンプル流通チャネルの内の少なくとも寸法諸元の少なくとも 1 つがメソ規模であることよりなる分析対象物の確定システム。

30 【請求項 19】請求項 11 から 16 までの何れか一項に記載の確定システムと該システムと共に使用される取付け基部との組合せシステムであって、前記取付け基部が前記システムのホルダー、前記サンプル前処理装置のサンプル入口部と内部接続された試験サンプルの入口溝、及び試験サンプルを前記コンダクター前処理装置の流通通路に沿って移動させる推進機構とからなる組合せシステム。

【請求項 20】請求項 19 に記載のものであって、前記取付け基部がさらに前記試験サンプルの貯留器を備えてなる組合せシステム。

【請求項 21】請求項 17 または 18 に記載のシステムと該システムと共に使用される取付け基部との組合せシステムであって、前記取付け基部が前記システムのホルダー、前記サンプル前処理装置のサンプル入口部と内部接続された試験サンプルの入口溝、前記サンプル前処理装

置の流通通路に沿って前記試験サンプルを移動させる推進機構、前記サンプル前処理装置の流通チャネルの前記入口部と内部接続された搬送流体の入口溝、及び前記流通チャネルに沿って前記搬送流体を移動させる推進機構とからなる組合せシステム。

【請求項 2 2】請求項 21 に記載のものであって、前記取付け基部がさらに前記搬送流体の貯留器を含むことよりなる組合せシステム。

【請求項 2 3】請求項 21 または 22 に記載のものであって、前記取付け基部がさらに前記分析対象物検出装置又は前記ポリヌクレオチド分析装置内の前記試験サンプルのパラメータを検出する検出器を含むことよりなる組合せシステム。

【請求項 2 4】細胞由来の所定ポリヌクレオチドの増幅反応の分析を行うシステムであって、前記システムが請求項 1 記載のサンプル前処理装置及びポリヌクレオチド増幅を行う増幅装置から構成され、前記増幅装置が、サンプル入口部が形成されている剛性基板と、ポリヌクレオチドを増幅する試薬を含み、前記入口部と流体伝達関係にあるポリヌクレオチド増幅領域と、前記サンプル流通チャネルと少なくとも 1 つのメソ規模寸法を有するポリヌクレオチド増幅領域と前記細胞を溶離するための前記反応領域内の溶離手段とからなる流通システムとからなり、前記サンプル前処理装置の流通チャネルの送り出し部が前記ポリヌクレオチド増幅領域のサンプル入口部と流体伝達関係にあることよりなる分析システム。

【請求項 2 5】請求項 24 に記載のものであって、前記ポリヌクレオチド増幅領域において、前記サンプル流通チャネルが前記入口部と前記ポリヌクレオチド増幅領域とを内部接続し、前記ポリヌクレオチド増幅領域とこれに接続されたサンプル流通チャネルとの内の少なくとも 1 つの寸法諸元の少なくとも 1 つがメソ規模であることよりなる分析システム。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 参考関連出願

この出願は次の係属中の特許出願の一部継続の出願である：1992 年 5 月 1 日付け米国特許出願第 07/877, 702 号；米国特許第 5, 304, 487 号である米国特許出願第 07/877, 563 号の分割出願である、1994 年 2 月 14 日付け米国特許出願第 08/196, 021 号；現在放棄された、米国特許出願第 07/877, 702 号の継続出願である 1994 年 5 月 26 日付け米国特許出願第 08/250, 100 号；現在放棄された、米国特許出願第 07/877, 662 号の継続出願である 1994 年 9 月 19 日付け米国特許出願第 08/308, 199 号。上述の特許及び特許出願に開示全体が本願明細書において参照に用いられる。

#### 発明の背景

この発明は、小さな寸法を有し、全血等の微量な試験サンプルの効果的な前処理を促進し、試験サンプルに存在する分析対象物質を確定し及び／又は処理するサンプ

ル前処理装置に関する。また、本件発明は、例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等の予め選択されたポリヌクレオチドの増幅を含む種々の検定プロトコルを分析と同時に実行するようにデザインされた類似の寸法の装置と、上述の装置とを含む試験システムに関する。

この 10 年間に於いて、技術的には種々の原因分析や監視の目的で、生物学的サンプルの分析を実行する多数のプロトコル、試験用具及び装置が開発されてきた。免疫学的検定法、免疫定量検定法、凝固反応検定法、ポリヌクレオチド増幅、種々の配位子-受容体の内部反応及び複合サンプルにおける種の偏差移動を含む分析法の全てが、種々の生物学的な微分子は汚染物質の存在や量、特定の形式の細胞の存在を確定するために使用されてきた。

最近、生物学的サンプルを取扱い、及び特定の臨床学的試験を行うための小型で使い捨ての装置が開発された。庄司らによってシリコンウエーハ上に形成された小型の血液ガス分析機の使用が報告されている。庄司, 等., サンサー・アンド・アクチュエータ, 15 号: 101~107 (1988)。佐藤らによって微細機械シリコン装置を使用する細胞融合技術が報告されている。佐藤, 等., サンサー・アンド・アクチュエータ, A21-A23 号: 948~953 (1990)。チバ・コーニング・ダイアグノスティクス社 (米国) によって血液凝固を検出する、マイクロプロセッサ制御のレーザー光度計が製造された。

微細加工技術は最初は微細電子分野において開発されたものである。アンジェル, 等., サンエンティフィク・アメリカン, 248 号: 44~55 (1983)。微細加工技術は 10 ミクロン (生物学的細胞の寸法) からナノメータ (いくつかの生物学的な高分子の寸法) までの範囲の、微細な寸法の製造的要素を有する微細工学的装置の製造を可能とした。例えば機械的な挙動特性及び流動特性等、微細機械学の研究には上述の小さな構造を有するデータを報告する多くの実験が含まれている。生命科学においては上述の装置の潜在的能力は十分に活用されていない。

ブルネッテ (Exper. Cell Res., 167 号: 203~217 (1986) 及び 164 号: 11~26 (1986)) によってシリコン、チタニウムコーティングポリマー及びその類似物の溝内における繊維芽細胞及び上皮細胞の挙動が研究された。マッカーートニーら (Cancer Res., 41 号: 3046~3051 (1981)) によって溝付きプラスチック基体における腫瘍細胞の挙動が実験された。ラセル (Blood Cells., 12 号: 179~189 (1986)) によって微細循環における見識を得るべく、微細毛細管内における白血球及び赤血球の流れが研究された。フング及びワイツマンによって微細機械における流体力学の研究が報告されているが、分析装置と関連したデータを得るものではなかった。フング, 等., Med. and Biol. Engineering, 9 号: 237-245 (1971) ; ワイツマン, 等., Am. Inst. Chem. Eng. J., 17 号: 25~30 (1971)。コロンプス等によって多チャネルの実験的試験装

置においてイオン選択電極を分離するために、生物学的流体の毛細管流を制御する場合において直交する方向のV字状溝を圧印しかつ積層した2枚のシートが利用された。コロンブス, 等., Clin. Chem., 33号:1531-1537 (1987)。増田ら及び鷺津らによって細胞の取扱い操作(例えば、細胞融合)のための流体流通チャンバーの利用が報告された。増田, 等., IEEE/IAS会議会報, 頁1549-1553 (1987); 鷺津, 等., IEEE/IAS会議会報, 頁1735-1740 (1988)。この技術は流体サンプル、特に生物学的分析の分野における分析対象物質の確定のための微細工学的装置の潜在的な使用については十分に検討されなかった。

ポリヌクレオチド増幅技術を用いた生物学的分析はよく知られている(例えば、マニスチス, 等., モレキュラー・クローニング: 実験マニュアル, コールド スプリング・ハーバー・ラボラトリー出版社:1989, 頁14.1-14.35参照)。そのような技術の1つがPCR増幅であり、これは熱安定ポリメラーゼ、例えばタックDNAポリメラーゼ(チン, 等., J. Bacteriol., 127号:1550 (1976)), ヌクレオシド三リン酸塩、及び異なる連鎖で、テンプレートDNAの両端の螺旋構造上に存在する連鎖に対して相補的な連鎖を有する2つのオリゴヌクレオチドを用いて、DNAテンプレート上で実行されることができ、これは増幅されるべきDNA断片(プライマーズ)の側面に位置する。反応成分は二重螺旋構造のテンプレートDNAの交雑を外すためのより高い温度(例えば94℃)と、これに続くアニール及び重合のためのより低い温度(例えば65℃)との間で循環される。脱交雑の温度と、アニール及び重合の温度との間で繰り返される循環反応によってテンプレートDNAのほぼ指数関数的な増幅が与えられる。温度循環を用いて自動的にPCR連鎖反応を実行する装置は市販されている(パーキン・エルマー社)。

PCR増幅は遺伝的障害の診断(エンゲルク, 等., Proc. Natl. Acad. Sci., 85号:544 (1988))、臨床学的サンプルにおける病原性微生物の核酸連鎖の検出(オウ, 等., サイエンス, 239号:295 (1988))、法廷証拠、例えば精液の遺伝的特定(リー, 等., ネイチャー, 335号:414 (1988))、活性化された腫瘍形成遺伝子(フエアー, 等., Proc. Natl. Acad. Sci., 85号:1629 (1988))及びクローン分子の種々の特徴(オステ, バイオテクニクス, 6号:162 (1988))における突然変異の分析に利用されている。PCR検定は探子として使用する、クローン形成された二重螺旋構造DNAの特定の連鎖の形成、cDNA断片の選択的増幅によって非クローン遺伝子のための特定の探子の形成、少量のmRNAからcDNAの収集物の形成、連鎖のための大量のDNAの形成及び突然変異の分析等の広範囲の用途に利用されることができる。父性特定のための試験、及び遺伝的疾患や感染性疾患の試験、等の臨床学的試験における広範囲の潜在的用途において臨床学的に用

いられることのできる、ポリヌクレオチド増幅を実行するための便利で、迅速なシステムが必要とされている。

微生物の確定に利用されている現在の分析技術はほとんど自動化されておらず、通常は組織の数を増加させるために適当な媒体中での培養を必要とし、及び一般的には対象物の系統や亜種の特定のために視覚的及び/又は化学的手法が採用されている。かかる手法における固有の遅れはしばしば感染症の最終的な特定の前に医学的な補助を必要とする。産業、公衆衛生あるいは臨床学的環境において、上述の遅れは不幸な結果を招来する。微生物を迅速に検出する便利な装置が必要とされる。

本件発明の目的は非常に少量によって流体サンプルを迅速かつ効率よく分析でき、非常に低い濃度で流体サンプルに存在する物質を特定できる関連的分析装置とともに使用されるサンプル前処理装置を提供することである。他の目的は生物学的用途又は他の用途の範囲において細胞内分子、例えばDNAを含む、予め選択された分子状又は細胞状の分析対象物質の迅速かつ自動的な分析を促進させることのできる、微細形成された構造的要素を有する使い捨て可能な小型(例えば、体積で1cc以下)の装置を提供することである。本件発明のさらに他の目的は迅速な臨床学的試験、例えばウィルス性又はバクテリア性の感染症の試験、遺伝学的分離の試験、精液運動性の試験、血液特性の試験、食物、体液及び類似物質中の汚染物質の試験等に各々用いられることのできる、上述の装置の改良を提供することである。

#### 発明の概要

本件発明は種々の生物学的分析及び他の分析のための微粒子成分、例えば細胞を含む試験サンプルの微量断片を都合よく与える、微細形成されたサンプル前処理装置を提供する。さらに、本件発明は微細形成された分析対象物質の検出装置、例えば免疫学的検定装置及び/又はポリヌクレオチド増幅を実行する微細形成された装置とともに、本件発明の微細形成されたサンプル前処理装置を含む分析システムを提供する。

本件発明のサンプル前処理装置は流体伝達関係にあるサンプル入口部とサンプル出口部とを有するサンプル流通通路と、入口部と出口部との間に配置されたセパレータとを含む。このセパレータは流通通路内に分離領域を形成する上流対面部分を有し、分離領域では流体サンプル内に存在する微粒子成分が収集されるようになっている。この装置は好ましくは分離領域と流体伝達関係にある流通チャネルを含み、これは収集された微粒子成分を分離領域から送り出すことができるようになっている。この流通チャネルは搬送流体を分離領域内に案内するとともにセパレータの上流対面部分を越えて案内する入口部分と、搬送流体をセパレータの上流対面部分を越えて案内するとともにセパレータの外方に案内する送り出し部とを含む。少なくとも1つの流通通路及び流通チャネル部分は後の説明で特徴付けられているように、少なく

とも1つのメソ規模寸法を有する。

本件発明の1つの実施形態によれば、流通通路は少なくとも1つのメソ規模寸法を有し、セパレータは流通通路における制限された流通領域を含み、これは流通通路の少なくともメソ規模寸法よりも小さく、及び流体サンプルから微粒子成分を分離するのに十分に小さい少なくとも1つのメソ規模寸法を有する少なくとも1つの流通路部分によって形成される。

本件発明のサンプル前処理装置は公知の微細組立て技術を用い、剛性基体の表面に形成された流通通路及び流通チャンネルを備えて製作されることができる。好ましい実施形態において、構造的要素が形成される基体の表面はカバー、例えばその表面に取付けられる透明ガラスカバー又は透明プラスチックカバーによって覆われている。

本件発明のメソ規模サンプル前処理装置は特に係属中の米国特許出願第07/877,702号の対象であるメソ規模検出装置及び／又は係属中の米国特許出願第08/308,199号の対象であるメソ規模ポリヌクレオチド増幅装置に関連して使用されるのに適する。'702号及び'199号の出願の開示全体は後述される場合には十分に、上述で注記されたように、本件出願で参照されることによって利用される。

上述のメソ規模装置はさらに後で詳細に説明されるが、分析システムとして機能するように種々の組合せで使用されることができる。1つの実施形態において、装置は細胞を含有した試験サンプルの分析に利用されることができる。本件発明のサンプル前処理装置によって与えられた試験サンプルの断片は、連続的に又は基本的には同時に分析されることができる。

メソ規模検出装置は種々の分析対象物を確定できるが、これは剛性基体とメソ規模流通システム及び選択的には流通チャンネルから構成され、剛性基体はサンプル入口部分を決定するように微細形成され、メソ規模流通システムは入口部分に対して流体伝達関係にある分析検出領域を含み、流通チャンネルは入口部分と分析検出領域とに対して内部接続されている。少なくとも1つの分析検出領域とサンプル流通チャンネルとがある場合、これらは少なくとも1つのメソ規模寸法を有する。分析対象物の検出領域には試薬が設けられ、これは分析対象物と反応し、分析対象物を確定しうる検出可能な生成物を生成するようになっている。1つの実施形態において、試薬は結合物質、選択的には検出領域において固定的な支持体又は可動の支持体上に固定され、特に分析対象物と結合する結合物質である。また、上述の生成物を検出するためのディテクターが含まれ、これは試験サンプル内の分析対象物の確定を許容する。

メソ規模のポリヌクレオチド増幅装置は剛性基体とメソ規模流通システム及び選択的には流通チャンネルから構成され、剛性基体はサンプル入口部分を決定するように

微細形成され、メソ規模流通システムは装置の入口部分に対して流体伝達関係にあるポリヌクレオチド増幅領域を含み、流通チャンネルは入口部分とポリヌクレオチド増幅領域とに対して内部接続されている。少なくとも1つのポリヌクレオチド増幅領域とサンプル流通チャンネルとは後者がある場合には少なくとも1つのメソ規模寸法を有する。また、ポリヌクレオチド増幅領域のサンプル流通領域上流側には生物学的試験サンプルの細胞成分を溶離する溶離手段が設けられている。かかる装置はPCRを実行するために利用されることができ、この場合にはポリヌクレオチド増幅領域は適切な試薬を含み、例えば各サイクル毎に二重螺旋構造が外され、プライマーが一重螺旋構造までアニールされ、プライマー間で増幅されたポリヌクレオチドが合成されるように温度を制御する等、試薬の繰り返し温度変化させる手段が設けられている。

ここで説明した各分析装置は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用されるか否かに関係なく、本件発明の範囲に含まれる。

上述の装置は通常は装置のホルダーとして機能する取付け基部とともに使用され、取付け基部は装置上の1又は複数の口部を取付け基部内の1又は複数の流通ラインに一致させるようになっている。分析対象物を含有する全血等の試験サンプルはサンプル前処理装置の入口にセットされた後、取付け基部又は装置自体に一体化されることのできる推進機構、例えばポンプが採用され、サンプルは流通通路に沿って分離領域を経て流通される。微粒子成分を含まないサンプルは前者の出口部が後者の入口部に対して流体伝達関係にある、サンプル前処理装置から分析対象物検出装置に向けて搬送される。分離領域に残存する血液細胞や他の形成された物体等の微粒子成分は分離領域から送り出され、ポリヌクレオチド増幅装置の入口部に対して流体伝達関係にある、サンプル前処理装置の流通チャンネルの送り出し部を経てポリヌクレオチド増幅装置に搬送されることができる。他方、試験サンプルはサンプル前処理装置に注入されることができ、あるいはこのサンプルは毛細管の作用によって入口を経てメソ規模サンプル前処理装置内に進入することができる。選択的には上述の装置内で実行される分析プロトコルに基づき、取付け基部もまた装置内に試薬、例えば分類された結合物質、ポリヌクレオチド増幅試験、バッファ、あるいは所望の分析を実行するのに必要な他の試薬等を注入するようにデザインされることができる。

本件発明の装置及びシステムは細胞や分子の分析対象物を含む種々の臨床学的試験を自動的に、高感度に、しかも迅速に実行するために、あるいは反応又は細胞の成長を監視するために用いられることができる。分子又はイオンの分析対象物の存在又は濃度の確定、特定の形式の細胞の存在の確定、あるいは細胞内の遺伝子連鎖又は組換えDNA連鎖の存在の確定を含むいかなる試験も基本



的には本件発明の装置及び分析システムを用いて上手く実行されることができる。これらのメソ規模装置によって病原性のバクテリア又はウイルスを検出する迅速な化学的試験を提供することができる。また、この装置によって血液成分、例えばホルモンの存在又は濃度のための迅速な試験を提供できる。さらに、限定されるものではないが、有用な用途に血液型テスト等の他の生物学的検定方法が含まれる。

本件発明の装置及びシステムは使用前に容易に殺菌されることができる。本件発明の装置及びシステムを用いて実行される試験は容易に終了させることができ、試験が終了すると装置を廃棄することができ、これはサンプル間の汚染を防止し、潜在的に有害な物質を埋没し、廃棄のための微量の廃液のみを生成し、安価な分析を可能とする。

本件発明のその他の効果及び特徴はさらに説明され、当業者には添付図面を参照しつつ、後述の本件発明の詳細な説明からより明確になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

第1図は透明カバーを通して見た、本件発明のサンプル前処理装置を示す概略斜視図である。

第2図及び第3図はサンプル前処理装置の部分を経た流通通路内に制限された流通のセパレータ（フィルター形式）を微細加工した他の実施形態を示す一部平面図であり、セパレータは流通通路を経た試験サンプルの流れを制限する一連の通路部分を有している。

第4図は装置を保持するとともに装置を経た流体の流れを整えるのに役立つ取付け基部と組合された、本件発明のサンプル前処理装置の概略断面図である。

第5図は第1図に示される同一の装置を示す概略平面図であり、その各出口部は第1、第2の微細加工分析構造部と流体伝達関係にあり、微細加工分析構造部はサンプル前処理装置によって与えられるサンプル断片に対して独立した分析を実行するようにデザインされている。

第6A図及び第6B図は分離領域からの流通通路の出口部が種々の検定プロトコルを実行するために分析装置のサンプル入口部と流体伝達関係にある、本件発明のサンプル前処理装置を示す概略断面図である。両装置は取付け基部と組合せて示され、取付け基部は装置を保持し、装置を通過する流体の流れを整え、及び第6A図に示される実施形態においては装置を通過した流体の流れに沿った所定の位置での差圧を検出するのに役立つようになっている。第6A図は横方向に突き合わせた装置を示し；第6B図は積み重ね配列の装置を示す。

第7図はポリヌクレオチド増幅を実行するために、分析装置のサンプル入口部と流体伝達関係にある搬送流体流通チャンネルの出口部を有する本件発明のサンプル前処理装置の概略断面図である。両装置は取付け基部と組合せて示され、取付け基部は装置を保持し、装置を通過した流体の流れを整え、装置を通過した流体の流れのコー

スに沿う所定の位置で差圧を検出するのに役立つ。

第8A図及び第8B図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用することを意図した2つの分析装置を示す概略平面図である。第8A図の装置は2つのメソ規模流通システムを有し、各々は分析対象物を捕獲するため、選択的には検出するために、流通チャンネルによって単チャンバーに内部接続されている。第8B図は酵素免疫学的検定を実行するとともに2つの捕獲チャンバーを有する類似のデザインが示されている。蛋白質等の分析対象物は例えば適切な免疫的捕獲試薬によって第1のチャンバー内に捕獲され、抗体-酵素共役によって分類され、発色性基体に露出されることができる。酵素は基体を例えば適切な免疫的捕獲試薬によって捕獲される発色団に変換し、第2のチャンバーにおいてそれは発色団を濃縮し、背景のシグナルを減少させる。第2のチャンバーは選択的には同様に発色団の検出に用いられることができる。

第9図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用することを意図した微細加工された分析装置を示す概略平面図である。この分析装置は種々の検定プロトコルを実行する際に使用される試薬、洗浄液及びその類似物質の添加及び混合のタイミングを一致させるうの一連の屈曲チャンネルを含む；第9A図に示されるように、単チャンバーは分析対象物の捕獲及び検出のために設けられ；第9B図は分析対象物の捕獲チャンバー及び独立した分析対象物の検出チャンバーを有する他の装置の実施形態の一部拡大図である；第9C図は分析領域において流れの制限によって分析対象物の検出を許容する分岐された流通通路領域を含む他の装置の実施形態の一部拡大図である。

第10A図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用され、微量サンプルに基づいて種々の検定プロトコルを実行する他の実施形態の分析装置を示す概略平面図である；

第10B図は第1の流通通路の一部分を示す拡大平面図であり、そこを通してサンプル流体が第10A図に示される装置のサンプル入口部分に導入される；

第10C図は第10B図の10C-10C線に沿った第1の流通通路の一部横断面図であり、第1の流通通路を構成する側方に隣接配列されたV字状チャンネルを示す；

第10D図は第10C図の10D-10D線に沿った第1の流通通路の一部縦断面図であり、V字状チャンネルを分離する障壁の特定の構造的特徴を示す；

第11A図は本件発明のサンプル前処理装置と共に使用することを意図した分析装置の概略平面図であり、分析装置は細胞の分類、細胞の分離及びPCR等のポリヌクレオチド増幅を含む種々の手順を実行するのに適した一連のメソ規模チャンバーを有する；第11B図はメソ規模PCR分析装置のための他のデザインを示す概略平面図である。

第12A図及び第12B図は本件発明のサンプル前処理装置の流通通路に配置された微細加工され、流れを制限する

セパレータの他の実施形態を示す一部平面図である。

第12C図及び第12D図は本件発明のサンプル前処理装置の流通通路に配置された微細加工され流れを制限するセパレータのさらに他の実施形態を示す長手方向の一部断面図である。

類似の参照符号は添付図面に現れる類似の部分を示している。

#### 発明の詳細な説明

本発明のサンプル前処理装置は好ましくは厚み1～数ミクロン以下、面積は $0.1\text{cm}^2 \sim 0.5\text{cm}^2$ の範囲の寸法を有するチップ形状を有する剛性基体を含む。この基体には微細加工にてサンプル流通通路が形成され、サンプル流通通路は入口及び出口及び入口と出口の間の中間に配置されたセパレータを有している。セパレータの上流対面部分は流通通路内に分離領域を形成し、分離領域内では試験サンプルの微粒子成分が収集される。また、この装置は分離装置と流体伝達関係にある流通チャネルを含み、これは収集された微粒子成分を分離領域から送り出すように機能する。この流通チャネルは入口部分及び送り出し部分を有し、入口部分は搬送流体を分離領域内に、及びセパレータの上流対面部分を越えて案内し、送り出し部分は微粒子成分が浮遊している搬送流体を分離領域の外方に案内するようになっている。上述の流通通路及び流通チャネル部分の少なくとも1つは少なくともメソ規模の寸法を有する。

サンプルの微粒子成分が分析されるべきでない場合、これらは分離領域に残存することができ、その場合において流通チャネルは基本的には機能せず、従って装置から除去されることができる。

ここで、“メソ規模”とは少なくとも1つが $0.1\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.2\mu\text{m} \sim 500\mu\text{m}$ の範囲の断面寸法を少なくとも1つ有する、流通通路又は流通チャネル及び、反応及び／又は検出チャンバー等の他の構造的要素を表す。この流通通路及びチャンバーの好ましい深さは $0.1\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、より好ましくは $2\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ の範囲である。流通通路の好ましい幅は $2\mu\text{m} \sim 200\mu\text{m}$ 、より好ましくは $3\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ の範囲である。チャンバーの好ましい幅は $0.05\text{mm} \sim 5\text{mm}$ 、より好ましくは $50\mu\text{m} \sim 500\mu\text{m}$ の範囲である。セパレータにおける流通通路の幅は典型的には大部分の生物学的サンプル及び他の試験サンプルから微粒子物質を分離するのに十分小さい $50\mu\text{m}$ 以下の範囲である。セパレータの流通通路は通常は約 $0.1\mu\text{m}$ から約 $100\mu\text{m}$ の深さを有する。セパレータの流通通路の長さは約 $0.1\mu\text{m}$ から約 $5\text{mm}$ の範囲内にある。

流通通路及び他の構造部分は断面で見た時に三角形、楕円形、四角形、矩形又は他の形状をなし、与えられた構造を経た又は構造内へのサンプル流体の流れの通路を横断するその少なくとも1つの断面形状寸法は、メソ規模である。

本件発明のメソ規模の装はここで説明される分析装置とともに、広範な生物学的分析におけるサンプル前処理を促進させ、種々の試験サンプルにおける微量の分子的分析対象物及び細胞的分析対象物の双方を迅速に確定することを可能とする。分析が終了すると、装置は代表的には廃棄される。

少なくとも1つのメソ規模寸法を有する少なくとも1つの流通通路又は他の構造要素を備えたメソ規模装置は、当業者にとって公知の種々の微細加工手法を用いて剛性基体材料から大量生産的に設計され組立てられることができる。かかる手法にはスピンコーティングや化学的蒸着等の薄膜蒸着技術、例えばUV又はX線プロセス等のレーザー加工又はフォトリソグラフ技術、湿式化学プロセス又はプラズマプロセスのいずれか一方によって実行されることのできるエッチング手法、LIGAプロセス又はプラスチックモールドが含まれる。例えば、マンツ等のトレンド・イン・アナリティカル・ケミストリー 10号:144～149 (1991) 参照。

本件発明のサンプル前処理装置は適切な基体の表面に流通通路及びセパレータを形成した後、その表面上にカバーをマウントすることにより便利に製作されることができる。剛性基体及び／又はカバーはシリコン、ポリシリコン、シリコンガラス、熱電対材料、ガリウム砒化物、ポリイミド、シリコン窒化物及び二酸化シリコン等の材料によって構成されることができる。また、カバー及び／又は基体はアクリル、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレンあるいは他の樹脂材料等のプラスチック材料で構成されることができる。選択的には、カバー及び／又は基体は透明材料、例えば比較的薄い、陽極的に結合されたガラス層あるいは超音波溶接されたプラスチック製シート材料で構成されることができる。他方、類似の材料の2つの基体がサンドイッチされることができ、あるいは適切な基体材料が2つの透明カバー材料の間にサンドイッチされることができる。

第1図には本件発明のメソ規模サンプル前処理装置の1つの実施形態の概略が示されている。この装置10は適切な基体11内に微細組立てされ、これによりサンプル入口部14及びサンプル出口部16を有するサンプル流通通路12a及び12bが形成されている。フィルター形式のセパレータ18が入口部14と出口部16との間の流通通路に挿入されている。セパレータの上流対面部分20には試験サンプルの微粒子成分を収集する分離領域22が形成されている。また、装置は分離装置22と流体伝達関係にある流通チャネル24a及び24bを含み、搬送流体を分離領域に分配し、収集された微粒子物質を分離領域から送り出すようになっている。流通チャネル24a、24bは搬送流体、例えば等浸透圧バッファを供給源(図示せず)からセパレータ18の上流対面部分20を越えて案内する入口部分26を有する。送り出し部分28は搬送流体をフィルター要素の表面を越え、分離領域22の外方に搬送するようになっている

る。

セパレータ18はサンプル前処理装置のサンプル流通通路12a、12b内に微細組立てされ、分析の前に装置を通じた試験サンプルから微粒子物質を除去するのに役立つようになっている。第2図及び第3図に示される、1つの実施形態において、セパレータは流通通路12a、12bに比して寸法の小さい一連のメソ規模通路部分によって構成されている。操作において、セパレータ18はフィルターとして機能し、微粒子物質をその上流側表面18aに蓄積する一方、通路部分を出た濾過物質は流通通路12bに沿って連続するようになっている。フィルター通路部分19は約5 $\mu$ mないし約50 $\mu$ mの範囲の深さ及び幅で微細組立てされ、この場合に流通通路12a、12bはほぼ1000 $\mu$ mの程度の最大深さ及び最大幅を有する。フィルター要素は流通通路内に配置された基体材料の概ね起立した少なくとも1つの、好ましくは複数の突起を形成するように装置の基体内に微細組立てされるのが好ましく、これは分離領域を通過したサンプル流体の流れを制限するのに役立つようになっている。

第2図に示されるように、セパレータ18の上流対面部分の外方には突起部Pが設けられ、サンプル流体中の微粒子物質によって通路部分の閉鎖を阻止するのを促進するようになっている。また、セパレータ18の上流対面部分に近接して廃液溜め(図示せず)が設けられることができ、サンプル流体から取り除かれた不溶性体積物を収集するようになっている。

第1図から分かるように、セパレータ18は基本的にはサンプル入口部14と出口部16との間に固定的に位置する静止的構造であるのが好ましい。他方、しかしながらセパレータは流通通路内に一時的に配置されることもできる。例えば、磁性体微粒子の塊が磁界の作用によって流通通路12a、12b内の各々の固定位置に保持され、試験サンプルから微粒子物質を濾過させることができる。サンプルの流体部分は濾過物として微粒子物の間の隙間を通過する。適当な時間が経過すると、適用された磁界は除かれ、磁性体微粒子は所望の分析又は廃棄のために、流通通路から、そこに蓄積された試験サンプルからの微粒子物質とともに移送されることができる。

必要な場合、セパレータ18は試験サンプルから微粒子又は生成物を取り除くことを促進する試薬を含むことができる。混合した細胞個体群を含む生物学的サンプルの場合、例えば混合個体群内の目標とする特定の形式の細胞と解放可能に結合する結合物質は、セパレータに吸収され、あるいは固定され、目標とする形式の細胞を取り除きあるいは選択的に保持するように作用する。保持されるべきでない細胞は廃棄のために分離領域から搬送されることができる。保持された細胞はその後分析のためにリリースされるようになる。

本件発明のサンプル前処理装置は取付け基部、例えば第4図に断面図で示され、本件発明の分析システムを構

成する異なる装置に流体を分配し、装置から流体を送り出し、装置間で流体を搬送する取付け基部30と組合せて使用されることができる。この取付け基部30は装置10を保持し、口部、例えば装置10の口部14を取付け基部内の流通ライン33と一致させる収容凹所32を有する。この取付け基部は推進機構、例えば第4図に示されるポンプ34を含み、サンプルを装置の流通通路に送るようになっている。特定の分析対象物を含むことが疑わしい生物学的流体サンプルが取付け基部の入口35に供給された後、ポンプ34が作動されて装置10のサンプル入口14に搬送し、次に流通通路12a、12bを通過させる。ポンプ34は取付け基部30の要素として示されているが、必要な場合には公知の微細加工技術によって装置10に組み込むこともできる。しかし、コスト面を考慮すると、取付け基部30にポンプを配置するのが好ましい。他方、実行されるべき分析の性格により、サンプルは装置内に注入されることもでき、あるいはサンプルは毛細管の作用によって入口部を通して装置の流通通路部分に進入させることもできる。他の実施形態において、取付け基部はサンプル前処理チップ上に配置されることもでき、例えば装置上のカバーを無くし、サンプルが装置内に注入されることを許容されるように装置の入口部と接続された流通ラインを備えて設けられることができる。装置の微細組立て構造は液圧応用の全容積を充填されることができ、取付け基部は例えば装置又は取付け基部内に位置するバルブによって流体の流れが構造内を通過するように案内するのに利用されることができる。微細組立てシリコンチップ内へのバルブの一体化は技術分野で公知の方法によって達成されることができる。

取付け基部30の出口部36はここで説明した形式の分析装置を保持する類似の取付け基部の入口部と内部接続されることができ、これにより装置内10で処理されたサンプルは試験のために分析装置に送られる。

また、分析装置は装置のメソ規模流通通路及び他の構造部の内容物を観察するために取付け基部と組合せて利用されることができる。例えば、取付け基部は装置内のメソ規模構造部の内容物を観察するために顕微鏡(図示せず)を含むことができる。第1図に示すように、透明カバー29は装置の内容物を動的に観察することを容易にする窓として役立つようになっている。

第5図には第1図のサンプル前処理装置と、種々の結合検定プロトコル及びポリヌクレオチド増幅を実行するようにデザインされた分析装置110との組合せの概略図が示されている。この目的を達成するため、装置110は検定構造部112、及びポリヌクレオチド増幅/検定構造部122が設けられている。第5図に示される実施形態において、流通通路12a、12bの出口部は装置の検定構造部112の入口部114と流体伝達関係にあり；チャンネル24a、24bの送り出し部分28はポリヌクレオチド増幅/検定構造部122の入口部124と流体伝達関係にある。検定、他の試

験又は分析の実行に使用される試験は、試薬入口部116又は126の各々を介して導入されることができる。反応領域117は典型的には検定構造部112に設けられ、そこで適切な試薬が分析対象物と反応して分析対象物を確定しうる検出可能な生成物を生成するようになっている。いわば、形成された生成物質は分析対象物の性質又は量としての明確な情報を与える生成物である。この生成物は反応領域で生成された形態、あるいは検出を高めうる次の反応に支配される形態で検出されることができる。独立した反応／検出領域118はこの目的のために設けられることができる。

分析対象物—特定の結合物質を含む溶液は反応領域と流体伝達関係にある入口部（図示せず）を介して反応領域117に導入されることができる。水溶液中に導入された蛋白質結合物質は凍結乾燥された形態でメソ規模構造部に保持されることができる。他方、結合物質は例えばチャンバー表面に、又は可動、剛性相支持体、例えばチャンバー内に配置された磁性又は非磁性のポリマー微粒子に物理的吸着又は化学的吸着によって製造された後、分析装置のメソ規模チャンバー内に固定されることができ

る。装置110を用いてポリヌクレオチド増幅を実行する場合、サンプル前処理装置10の送り出し部分28から送られた対象の細胞が溶離剤又は上述の米国特許第5,394,487号に説明されているような分離構造のいずれかによる分離に支配される。目標のポリヌクレオチドは増幅領域127内で増幅を受けた細胞から放出され、増幅されたポリヌクレオチドは検出領域128で検出されることができる。1又は複数の開口116、119、126及び129がシステムを排気するために大気開口されることができる。結合検定構造部112及びポリヌクレオチド増幅／検定構造部122の操作はかかる装置の後述の他の実施形態を参照しつつさらに説明されるであろう。

第5図に示されるように、検定構造部112及びポリヌクレオチド増幅／検定構造部122は単装置として共通の基体上に形成されているが、この構造部は後で明らかになるであろうが別々の基体上に組立てられ、別々の分析装置又はチップとして機能することもできる。

第5図に示されるように、上述のサンプル前処理装置及び分析装置が分析システムとして機能するように一緒に使用された場合、例えばこのシステムは有利なことには第6A図、第6B図及び第7図に示される形式の取付け基部と組合される。上述の第4図の取付け基部と同様に、第6A図の取付け基部50は各装置に流体を分配し、各装置から流体を送り出し、各装置間で流体を搬送するのに役立つようになっている。取付け基部50はサンプル前処理装置10及び分析装置112を保持し、装置内の口部を取付け基部の流通ラインと一致させる収容凹所を有する。特に、流通ライン54aはサンプル前処理装置の入口部14と一致し、流通ライン54bはサンプル前処理装置の出口16

及び入口114と一致し、流通ライン54cは分析装置の検定構造部112の出口119と一致している。第6A図に示されるように、流通ライン54aは取付け基部入口部56と流体伝達関係にある一方、流通ライン54cは取付け基部の出口57と流体伝達関係にある。取付け基部は典型的には分析システムに対してサンプル流体を送る推進機構、例えばポンプ58を含む。微粒子を含む流体試験サンプル、例えば全血、分析対象物を含んでいることが疑わしい精液相が取付け基部50の入口部56に供給された後、ポンプ58が作動されてセパレータ18に対してサンプルを送り、微粒子成分が実質的に減少されたサンプル流体、例えば精液が提供される。実質的に微粒子生物がなくなったサンプル流体は試験、例えば免疫学的検定のために、流通ライン54bを介して装置10から検定構造部112に送られる。

分析装置の反応／検出領域内において結合基体に対する分析対象物自体又は分析対象物の反応生成物の結合は上述の参照された関連出願（例えば、米国特許出願第87,702号参照）に開示されているように、装置内のサンプル流体の圧力又は電気的導電性の監視を含む多くの手法により、あるいは視覚的又は機械によって透明カバーを介しての光学的な検出法により検出されることができる。例えば、第6A図に示される分析装置112の反応領域117内での結合物質と分析対象物との反応はメソ規模の流通通路の特定の領域におけるサンプル流体の圧力を監視することにより検出されることができる。これは口部14及び119を介して各々装置に出入りする流体の流通圧力を検出する2つの圧力検出器59a、59bによって第6A図の分析システム—取付け基部の組合せ内で実現されることができる。検定が行われている間、微粒子が凝集し、又は分子が化学的に相互反応してネットワークを形成し、反応／検出領域を通過するサンプル流体の制限された流通又は粘性の増加を招来すると、かかる変化は積極的な結果を示す圧力変化として検出されることができる。メソ規模の圧力センサー、及び他の電気的又は電気機械的センサーはシリコン基体上に直接組立てられることができるとともに、既に確立された技術によって大量生産されることができる。アンジェル、等、サイエンティフィック・アメリカン、248号:44~55（1983）。

取付け基部の他の実施形態は本件発明による他の装置とともに異なる検定プロトコルを実行する場合に使用されるために組立てられることができる。かかる実施形態の1つは第6B図に示され、これは分析システムの断面図を示し、取付け基部70内に設けられた収容凹所72内に配置され、サンプル前処理装置10'に積み重ねられた分析装置110'から構成される。微粒子を含有した試験サンプル流体が取付け基部の入口74に与えられると、推進機構、例えばポンプ75によってサンプル流体が装置10に送られ、分析のために微粒子成分が実質的に減少されたサンプル流体が分析装置110'に与えられる。分析装置110'のカバー116'はシステムの排気のために大気に開放

した隙間114'を有する。積み重ねの頂上に分析装置110'を配置することはカバー116'の透明部分を介して光学的検出を許容する。

第7図には上述の形式の取付け基部と組合された、サンプル前処理チップとポリヌクレオチド増幅のための分析装置とからなる分析システムの他の図が示されている。第7図の分析システムの断面図はサンプル前処理装置10とポリヌクレオチド増幅/検定構造部122とが配置された収容凹所を有する取付け基部90を示している。サンプル前処理装置10内の流通チャンネル24bの送り出し部28は流通ライン92を通してポリヌクレオチド増幅/検定構造部122の入口部124と流体伝達関係にある。流通ライン93は分析装置の出口部129と一致され、取付け基部は出口部94と流体伝達関係にある。

ポリヌクレオチドが例えば上述の適切な分離手段と接触することによりサンプル前処理装置10内のサンプル流体から分離された細胞成分からリリースされると、ポリヌクレオチドは増幅領域127に導入される。また、増幅のために必要な試薬は第5図に示されるように、入口部126を介して増幅領域127に加えられる。推進機構、例えばポンプ（図示せず）はポリヌクレオチドサンプルを流通ライン92を介して増幅領域127を分配するのに使用される。

増幅試薬は取付け基部又は分析装置（図示せず）に設けられた異なる流通ラインを介して増幅領域127に同様に分配されることができる。ポリヌクレオチド反応の生成物は上述の方法による検出のために領域128に送られることができる。結果生成物は必要な場合には取付け基部の出口部94を介して回収されることができる。

装置10及び122を通過した試験サンプル流体の流れの通路に沿った差圧は装置10の送り出し部28の上流点で圧力を測定するために取付け基部又は装置内に配備された圧力センサー（図示せず）と関連する圧センサー96を用いて測定されることができる。

取付け基部90はポリヌクレオチド増幅領域内における温度を制御する加熱/冷却要素95、例えば電気的加熱要素及び/又は冷却要素を含むことができる。他方、電気的加熱要素（図示せず）は増幅領域127下方の取付け基部内で電気接点と一致するように電気的に接続される電気要素とともに、分析装置122の基体内に集積されることもできる。他方、取付け基部は内部又は外部の加熱手段、例えばポリヌクレオチド増幅/検定構造部122の増幅領域に隣接して配置されるレーザー又は他の電磁気エネルギー源（図示せず）を含むことができる。取付け基部90内のマイクロプロセッサは脱交雑のために適した温度、例えば94℃と、アニール及び重合のために適した温度、例えば65℃との間でポリヌクレオチド増幅領域内における温度サイクルを与えるために、加熱要素を制御するのに用いられることができる。また、マイクロプロセッサ又は他の電気的コントローラが反応チャンバー

内の熱サイクルを検出し維持することを許容するように、熱電対が増幅領域を囲む基体内に取付け基部と電気的に接続されて設けられることができる。また、冷却要素、例えば小型熱電気ヒートポンプ（マテリアル・エレクトリック・プロダクツ社、トレントン, NJ）が増幅チャンバーの温度を調整するために取付け基部内に含まれることができる。他の実施形態において、ポリヌクレオチド増幅チャンバーの温度はガラスカバー109を介して反応チャンバーに指向されるタイムドレーザーパルスによって制御され、サンプルの連続加熱冷却が増幅サイクルのために必要な温度まで許容されることができる。シリコンの熱特性は迅速な加熱冷却サイクルを可能とする。

第4図、第6A図、第6B図及び第7図に示される本件発明の全ての実施形態において、ポンプは取付け基部内のマイクロプロセッサによって制御されることができる。また、最後に述べた図に示される装置は場合によって例えば取付け基部上にマウントされたクランプ（図示せず）、例えば接着により対面する装置表面の場合、あるいは収容凹所に対して装置を適切な寸法として装置を収容凹所に摩擦的に保持する、等を含む種々の方法により取付け基部の収容凹所にあるいは相互に確実に固定して保持されることができる。

第8A図には本件発明のサンプル前処理装置と組合せて使用されることができる生物学的検定装置が示されている。装置130は基体131上に組立てられ、基体131はチャンネルの両端に微細形成された入口部133を備えたメソ規模流通チャンネル132A、132Bと、中央のメソ規模の混合/捕獲/検出チャンバー135とが設けられている。第8A図に示されるように、チャンバー135の断面寸法はチャンネル132A、132Bのそれに比して大きくなっている。

分析対象物と特に結合する物質等の捕獲試薬はチャンバー135内の静的又は可動支持体のいずれか一方に固定されることができる。例えば、ポリマー微粒子等の可動支持体を使用された場合、微粒子の寸法は固定された試薬がチャンバー135内に閉じ込められるために、流通チャンネル132a、132bの断面寸法に比して大きくなるように選択されるべきである。このように微粒子剛性支持体上に固定された試薬は入口部137を介して上手くチャンバー135内に充填されることができる。

ここに述べた形式の装置は種々の免疫学的検定反応を実行するために使用されることができる。例えば、癌胚抗原（CEA）の確定のための非拮抗的免疫学的計量検定法は例えばプラスチックビーズ等の微粒子支持体に固定されたモノクロナル・抗CEA・抗体でチャンバー135を充填することにより実行されることができる。CEAのために分析されるべき試験サンプルは次にチャンバー135を充填するために加えられ、固定された試薬とともに導入された流体を追いつく。その後、チャンバー135の内容物は十分な時間保持されて抗原-抗体が十分に結合さ

れる。続いて、モノクロナル 抗CEA抗体 ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ等の抗体酵素共役がチャンバー内に加えられ、その内容物が再び保持される。発色性基体の溶液が次にチャンバー135に加えられ、これは固定された試薬を洗浄し、非結合の共役を追い出すのに役立つ。十分な基体がチャンバー内に保持されて固定試薬と結合して標識ペルオキシダーゼと反応する。発色団の生成速度はサンプル内のCEA濃度に直接的に比例する。

また、装置130は試験サンプル内のチロキシンを確定する拮抗的検定を実行するために使用されることができ、このフォーマットを実行する場合、チャンバー135にはプラスチックビーズの表面に結合した抗チロキシン抗体からなる固定試薬が充填される。チロキシンのために分析されるべき試験サンプルはチロキシ・ペルオキシダーゼ共役と予め混合されてチャンバー内に加えられ、チャンバー内に充填されるとともに固定試薬とともに導入された流体を追いつく。次に、チャンバー内の内容物は十分な時間保持されて抗原-抗体が十分に結合する。選択的にはバッファがチャンバー135を流通させて固定試薬が洗浄される。次に、発色性基体チャンバーに加えられ、固定試薬が洗浄されるとともに非結合試薬が追いつく。十分な基体がチャンバー内に保持され、固定試薬に結合した標識ペルオキシダーゼと反応する。発色団の生成は試験サンプル内のチロキシンの濃度に逆比例する。

第8A図の検定構造部はチャンネル135内の固定試薬を囲い込むように構成されているが、そのデザインは洗浄の目的で流体が固定試薬をポンプで注入し通過させることができるものである。

最後に述べた2つの実施形態は他の装置が種々の検定フォーマットを実行するのに使用できると同様に、第8A図の装置として単に例示されたものであることを利害されるべきである。

第8B図には基体141上に微細加工され、例えば免疫学的捕獲によって分析対象物を捕獲するためにチャンバー145と流体伝達関係にある入口部143を有する分析装置140が示されている。この装置は酵素免疫学的検定を実行するために適用される。その目的のため、装置は独立したチャンバー147を有し、これは適切な基体上の標識酵素の反応によって生成される発色団を捕獲し濃縮させるための結合剤を内蔵している。例えば、蛋白質分析対象物が“サンドイッチ”検定技術を用いて確定されることができ、その場合に分析対象物はチャンバー内に固定されて特定の分析対象物と結合する抗体によってチャンバー145内に捕獲される。捕獲された分析対象物は例えばアルカリ性ホスファターゼからなる酵素抗体共役と蛋白質分析対象物と特に結合する抗体とで識別される。フルオレセイン燐酸塩が標識酵素のための発色性基体としてチャンバー145内に導入される。アルカリ性ホスファタ

ーゼが基体上に作用してチャンバー147内に固定された抗フルオレセイン抗体によって捕獲されるフルオレセインが生成される。チャンバー147内には例えば構造部壁面に固着された材料によって疎水性環境が形成されると、捕獲剤又は反応混合成分、例えば界面活性剤又は膠質粒子形成剤が結合フルオレセインからの蛍光性信号を改善するであろう。発色団の検出はチャンバー147内で実行され、あるいは発色団が他の装置において検出されるために出口部149を介して装置から取り除かれることができる。この確定を実行する場合に4ニトロフェニール燐酸塩又は4メチルウンベリフェロン燐酸塩等の他の基体が脱燐酸化生成物を捕獲するために使用される結合剤とともに選択されることができ、

第9図には本件発明を実施する場合に使用されることができる生物学的検定装置の他の実施形態が示されている。装置150の基体151には口部152a~152e、流通チャンネル154a~154g、反応チャンバー156a、156b及び捕獲/検出チャンバー158が微細組立てされている。反応チャンバー156a、156bは各々屈曲メソ規模チャンネルを含む。屈曲チャンネルの通路長さはサンプル試薬の混合及び添加のタイミングが一致するようにデザインされることができる。この形式の装置は装置内の口部と一致される口部を有する取付け基部と組合せて利用されることができ、その取付け基部は装置の流通システムからの流体を分配し受け取ることができ、選択的にはチャンバー158内の積極的な又は量的な結果を光学的に検出することができる。装置の1つの用途において、サンプルのコレステロール成分が確定されることができ、コレステロールエステルが入口部152aを介して供給され、バッファ及びサンプルが入口部152b、152cを介して各々加えられる。次に混合物はチャンネル154dを経て屈曲した混合/反応チャンバー156aに送られる。混合及び反応の時間は屈曲チャンネルを適切な長さに微細加工し、流速を制御することにより予め設定されることができる。コレステロールオキシダーゼが口部152dを介して加えられ、チャンネル154gを経て屈曲チャンネル156bに送られ、そこでコレステロールオキシダーゼとチャンネル156a内の流体との間のタイミングのよい混合及び反応が起こる。上述と同様の加熱手段が装置を37℃又はそれ以上に保持するために設けられることができる。発色性基体が検出のために流通チャンネル（図示せず）を介して153eに導入される。積極的な又は量的な結果が例えばチャンバー上に配置された光学的窓を介して検出チャンバー158を観察することにより光学的に検出されることができ、検出チャンバー158には酵素反応の生成物を捕獲し、従って検出を促進させる能力のある固定結合半剤が設けられることができる。この装置は臨床学的酵素反応又は他の反応の範囲に適用されることができ、

第9B図に示されるたの実施形態によれば、識別された蛍光性分析対象物の捕獲は分析対象物及び分析対象物と



リリース可能に結合する特定の結合剤とを含むチャンバー158a内で起こる。リリースされた識別済み蛍光性分析対象物はチャンバー158b内で検出のために捕獲される。

第9C図に示されるさらに他の実施形態において、流通チャネル154fは流通活路がチャネル154eに比してより小さな断面積をなし、これにより装置を通過する試験流体の流れが制限されるように収縮されることができる。第9C図に示されるように、チャネル154fは各分析チャネルで小さな寸法を有し、結果的に狭い流通通路を与える平行流通通路のパターンで構成されている。この装置は種々の凝集検定の実行に利用されることができ、微粒子誘導凝集又は錯体合成物誘導凝集の現象が流通チャネル154fの分岐部分159を通過するサンプルの制限された流れに基づいて検出される。

第10A図は種々の結合検定プロトコルを実行するためにデザインされたメソ規模分析装置170を概略的に示す。この装置は微量のサンプルと測定された少量の試薬とに基づいて分析対象物の範囲を確定することができ、装置内には検出されるべき識別された生成物が生成され、その結果全てのサンプル、未反応試薬及び反応生成物が装置内に閉じ込められて残存し、その後廃棄されるようになっている。

この装置は第6A図を参照して説明された一般的形式の取付け基部（図示せず）と組合せて使用されることができる。かかる装置は装置を保持する収容凹所を有するとともに、流通ライン、及びサンプル、試薬、洗浄溶液およびその類似物を装置に分配するために共同するポンプ及びバルブを有する。また、取付け基部には全てここで説明されるように、温度コントロール及びセンサー手段、分析対象物の検出を促進する圧力センサー及び／又は電気コネクタ、光学的検出手段、信号増幅及び計量手段が含まれる。また、この組合せは装置全体のシーケンス及びコントロール要素、計量情報の表示及び例えば取付け基部のマイクロプロセッサを介して外部コンピュータと接続されることによって記憶する手段を含む。

この装置は上述のように0.01~100 $\mu$ Lの範囲、好ましくは約0.5 $\mu$ Lから約50 $\mu$ Lまでの全容積を与えるように構成される流通通路が微細加工されている。

使用に際しては微量の試験サンプル流体が入口部171に導入される。この試験サンプル流体は例えば入口部171に導入される前に、本件発明のサンプル前処理装置を通過させることにより予め濾過されることができる。他方、このサンプル流体は装置170内に導入された後に濾過されることもできる。内部濾過は横断流通濾過技術によって効率よく実現されることができる。第10Bに示されるように、入口部171に導入された後にサンプル流体が最初に通過する流通通路172は、2つの隣接するV字状チャネル172a、172bに分割され、長手方向の障壁172によって分離され、これは基体材料で形成されるのが好ましい（しかし、カバープレート又はシートの一部とさ

れ、そこから吊り下げられるであろう）。障壁173は装置のカバーとともに、第10C図に示されるように、少なくとも1つの流通通路部分を形成し、これは流体が流通するのを許容するが、流体サンプルの微粒子成分、例えば細胞の流通を阻止するのに十分小さい寸法である。障壁173はサンプル流体を流通通路172aには直接的に、流通通路172bには間接的に供給するように配置され、流通通路172b内を通過する流体は入口部171に導入された予め濾過されていないサンプルに比して微粒子成分が実質的に減少されている。

流通通路172は入口部の下流側において比較的小さな断面寸法から比較的大きな断面寸法を分岐するように、あるいは入口部の下流側において比較的大きな断面寸法と比較的小さな断面寸法とを集合させる壁面を備え、又少なくとも1つの流通通路の壁面にほぼ平行に配置される障壁173を備えて形成されることができる。かかるデザインはサンプル流体に非線形な流れを与え、流通通路部分174から微粒子を取り除くのを促進する。

試験サンプル流体が装置170の外方で濾過される場合、上述の内部フィルターは不要とできる。他方、内部濾過されたサンプル流体は入口部175を介して直接、従って流通通路172をバイパスして装置内に導入されることができる。また、必要な場合にはバッファが希釈されたサンプル流体の前処理のために入口部175を介して導入されることができる。過量のバッファは出口部176に収集されることができる。

流通通路172aに捕獲された微粒子物質は第10B図に示されるように出口部176に送られる。

流通通路172bの濾過物質は次に計量チャンバーとして機能するように適切な寸法に設定された流通通路177内に送られ、分析のために所定のサンプル量が与えられる。この所定のサンプル量は通常は約1 $\mu$ L程度である。装置170には分析のために装置内のサンプル流体の所望量を計量するのを促進するために、スケール178が例えばエッチング等で設けられることができる。規定のサンプル量を装置170内に導入することを可能とすることにより、流通通路177はまた分析対象物の計量を許容することとなる。

装置170内に、又はかかる装置と共に使用されるようにデザインされた取付け基部内に組み込まれた適切な推進機構（図示せず）が計量されたサンプル流体を流通通路179に搬送するために採用されることができ、これは選択的にはサンプル流体を結合検定を実行する場合に使用されるプライマリー試薬と混合するために設けられる。装置170内にかかる混合チャンバーを含むことは分析対象物とプライマリー試薬との間の迅速で完全な反応を達成する上で有益である。

サンプル流体、試薬、バッファ及びその類似物を装置170の流通システムに搬送するための適切な推進機構には種々のポンプ、例えば微細機械ポンプ、ダイヤフラム

ポンプ、シリンジポンプ、容積閉鎖ポンプ、同様に内方浸透圧誘導流、ガスの電気化学的旋回による誘導流及び当業者に公知の他のポンプ手段が含まれる。

プライマリー試薬は入口部180を介して装置内の流通通路179に直接的に分配されることができる。このプライマリー試薬は流通通路179に導入された後、計量されたサンプル流体と連続的に又は基本的には同時に混合されるようになる。適量のプライマリー試薬は出口部181を介して流通システムから送り出されることができる。

プライマリー試薬の供給源は選択的には装置170内に設けられることのできる内部格納チャンバーとされることができる。他方、プライマリー試薬は上述の第6A図で説明された取付け基部等、検定装置とともに使用される取付け基部内の貯蔵器から、あるいは装置外部の他の供給源から装置内に分配されることができる。このプライマリー試薬は乾燥又は凍結乾燥の形態、あるいは他の適切な形態で溶液、ゲル又はニートとして格納されることができる。例えば、プライマリー試薬は流通通路179内の場所において凍結乾燥されることができ、その場合に例えば入口部180を介して導入される試験サンプル流体又は適切な溶媒がプライマリー試薬を溶解するために使用されることができる。他方、試験サンプル流体又は溶媒は上述のように流体搬送手段により流通チャンネル179から第10図に示される流通システム外方の貯留チャンバー（図示せず）に案内され、プライマリー試薬を溶解させることもできる。さらに、加熱手段又は攪拌手段（図示せず）が貯留チャンバーに採用されてそこに貯留されたプライマリー試薬の溶解を促進させることもできる。

サンプル流体と溶解されたプライマリー試薬とからなるプライマリー反応混合物は又、上述のように、乱流を促進させる構造的要素を有する流通チャンネル179内で反応させることもできる。攪拌手段又は他の手段がプライマリー反応混合物の十分な混合を確保するために設けられることができる。このプライマリー反応混合物は所望の反応が終了するまでの十分な時間流通チャンネル179内に保持されるようになる。

第7図で説明したような、流通チャンネル179内の温度を整える手段が、選択的にはプライマリー反応状況が高めるために利用されることができる。また、流通チャンネル179内の温度検出する手段が必要な場合には設けられる。流通通路179内のプライマリー反応混合物の滞留時間と検出された温度とを相互に関連させるようにシステムの全体的機能を制御するマイクロプロセッサ又は類似の装置には温度検出手段が操作可能に接続されることができる。反応が終了すると、プライマリー反応混合物の全部又は一部が例えば上述のポンプ又は他の推進機構によって捕獲領域182及び検出領域183に送られることができ、そこでサンプル流体の1又は複数の原成分又はプライマリー反応生成物が監視され及び／又は検出される。他方、その存在又は濃度がサンプル流体内の分析対

象物の存在又は濃度と相互に関連する、2次反応の生成物が分析対象物の確定に採用されることもできる。

これらは結合検定を実行する場合に一般的に用いられる、装置170と関連して利用される検出技術である。簡単に言えば、これらは他の試験試薬によって実行されるような化学的試験；例えばプライマリー反応の間の化学的変化によって招来される分析対象物の特性における変化、例えば吸光度や波長におけるシフト、フルオレセイン分極の変化、フルオレセインストークスシフトにおける変化、及びその類似における変化を検出する分光器の使い方；顕微鏡、画像解析機又は類似の手順によって測定される凝集；及び反応したプライマリー混合物の電気化学的挙動の測定、例えば電流計及び／又は電位差計／電解電量計の技術による特定の測定を含む。

分析対象物の確定のための2次反応の実行に関し、流通通路182によって決定される捕獲領域が設けられ、捕獲領域には上述の形式の流体搬送手段によって反応したプライマリー混合物の全部又は一部が送り込まれ、捕獲領域内ではプライマリー反応混合物内の生成物の1又は複数の成分が表面への結合によって捕獲されることができ、結果的に検出及び／又は計量が行われる。捕獲試薬は流通通路182の壁面上、流通通路182内に存在する微粒子又はビーズの表面上、あるいは両者の上に固定されることができる。

プラスチック、ラテックス、シリカ又は、電磁気要素を含む適切な支持試料からなり、プライマリー反応混合物の生成物に特に結合する能力のある固相捕獲試薬を流通通路182に予め充填するために、入口部又は充填穴が設けられている。微粒子捕獲試薬は最終的には乾燥又は凍結乾燥される湿式スラリー、又は乾燥のいずれかの形態で流通通路182に注入されることができる。いずれの場合に流通通路への充填は選択的には振動手段又は他の手段によって補助されることができる。捕獲試薬の可動固相体は10ナノメートルから10ミクロンまでの寸法を有する微粒子又はビーズからなり、ビオジン化され又は共役抗体が特に結合するアビジン、ストレプトアビジン又は他の基体の表面コーティングがなされている。

流通通路182には流通を制限する構造的要素189a、189b又は他の手段が設けられて流通通路182内に捕獲試薬を閉じ込める一方、流体の通過を許容している。また、微粒子捕獲試薬は第8A図について説明されたように流通通路182内に閉じ込められることができる。

プライマリー反応混合物は捕獲試薬との反応が公知の程度まで進行する、好ましくは基本的に終了するのに十分な時間だけ流通通路182内に残留されるようになる。流通通路179に関して上記で説明したように、流通通路182内の温度を整え、検出する手段が選択的には設けられることができる。

プライマリー反応混合物の捕獲された生成物は2次反応の進行前に洗浄されるのが好ましい。



2 次反応のための試薬溶液は入口部185を介して装置170に直接分配される。過量の2次試薬は出口部186又は187を介して流通システムから取り除かれる。他方、2次反応のための試薬は溶解の前には保持されるとともに、装置170、装置と共に使用される取付け基部又は装置外部の幾つかの他の便利な供給源の貯留チャンバー内で使用される。1又は複数の流通ラインは装置170内の流通通路と適切に接続されるとともに、推進機構に操作可能に結合され、選択的に溶媒を入口部から、貯留された試薬が溶解されて2次反応溶液を生成する上述の2次貯留チャンバーに向けて搬送するように設けられる。2次反応のための試薬は捕獲されたプライマリー反応生成物と共役する酵素を特定する酵素质質、2次反応溶液に溶解した時に結合したプライマリー反応生成物の洗浄を補助する物質を含む。

2次反応は好ましくは流通通路182で起こり、2次反応溶液が捕獲したプライマリー反応生成物と反応する。2次反応生成物は光吸収特性、蛍光特性、燐光特性に基づいて検出可能な分子又はイオン；その放射特性によって検出可能な分子又はイオン；あるいは核磁気共鳴特性又は常磁性によって検出可能な分子又はイオン；の群から選択される物質である。2次反応の生成物は当該技術分野において公知の手順によって増幅されてその検出を高めることができる。例えば、酵素増幅反応が採用され、2次反応溶液内における非蛍光性先駆物質から生成されたフロロオレがリリースされる。

2次反応が終了した後、生成結果物は流通通路182内、又は結果的に検出領域183において、あるいは装置170外部の検出器において検出され、計量される。

サンプル流体の流通通路を横断する、流通通路177及び183の好ましい断面寸法は約100 $\mu$ mの幅、70 $\mu$ mの深さである一方、サンプル流体の流通通路を横断する、流通通路179及び182の好ましい断面寸法は約400 $\mu$ mの幅、70 $\mu$ mの深さである。これらの寸法は上述のようにメソ規模内にある。

捕獲及び分析対象物の検出の目的で、ポリクロナル及びモノクロナル抗体の両方を採用した免疫学的計量（サンドイッチ）検定及び拮抗的な免疫学的検定を含む種々の結合検定プロトコルが装置170内で実行されることができる。検出抗体の1つの形態は固相上に捕獲された後、結合半剤として検出可能なフロロオレである共役標識を含む。検出抗体の他の形態はプライマリー反応生成物からリリースされた後、検出されるフロロオレである共役標識を含む。検出抗体の他の形態はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ又はアルカリ性ホスファターゼ等の共役酵素半剤を含む。

洗浄工程は装置170から潜在的に干渉する物質を除去するのに適切な場合に実行される。

過量のサンプル流体、試薬、洗浄溶液及び類似物は結合されるとともに、種々の流通通路及び構造要素から、

好ましくは装置170内の十分な容積の単廃棄容器内に追いつき出され、全てのサンプル流体及び反応生成物が廃棄のために安全に収容される。

第11A図は生物学的な細胞含有の流体サンプル内の細胞内ポリヌクレオチドの存在を確定し、次に特定のヌクレオチド連鎖の検定を実行するために使用される分析装置191を概略的に示す。基体192上にはメソ規模の流通通路194a~194cが微細加工され、これは細胞分離チャンバー196a、細胞溶解チャンバー196b、フィルター要素197、部分198a及び198bを有するポリヌクレオチド増幅チャンバー、及び検出領域199を有する。また、メソ規模流通システムには流体出入口部193a~193dが設けられている。この装置は第6A図に付いて説明されたような取付け基部と組合せて使用されることができる。

最初に、上述の取付け基部内のバルブが口部193c及び193dを閉じる一方、口部193a及び193bを開くように作用する。例えば、サンプル前処理装置から送られてきた混合細胞を含むサンプルが、ポンプ（図示せず）等の適切な推進機構によってサンプル入口部193aに案内され、流通チャンネル194aを経て分離チャンバー196aに送られる。チャンバー196aはチャンバー壁面上に固定された結合半剤を含み、これはサンプル内における所望の形式の細胞上の分子表面に選択的に結合する。残りの細胞成分は口部193bを介して基体を出る。チャンバー196a内で所望の形式の細胞と結合した後、洗浄し及び目標細胞の分離を確保するために、流れがバッフアを伴って継続される。次に、口部193bが閉じられ、口部193cが開かれる。流れは次に固定された細胞をチャンバー196aから取り除くために十分に増加される。流れが継続されて細胞をチャンバー196b内の突部195を貫通する膜を通過させて細胞を開裂して細胞内物質をリリースさせる。サンプルの流れはフィルター197を通過するまで継続されて大きな細胞膜及び破片が除去され、濾過物質は流通チャンネル194bによってPCRチャンバー部分198bに接続されたメソ規模チャンバー部分198aに送られる。PCR検定に必要な標識ポリメラーゼ、プライマー及び他の試薬は次にその供給源（図示せず）から口部193cを介して部分198bに加えられる、分離された細胞副次集団から細胞内溶解性成分とPCR試薬との混合を許容する。（反応混合物が蒸発しないことを確保し、装置からの損失を防止すべく）口部が閉じられると、ポンプ（図示せず）等の推進機構が口部193bに駆動力を加え、PCRサンプル及び試薬を各々94℃と65℃に設定された口部198aと口部198bとの間の流通チャンネル194bに循環させ、複数のポリヌクレオチドの溶解及び重合のサイクルを実行し、試料のポリヌクレオチドの増幅を許容する。次の処理工程の前に、口部193cが閉じられ、口部193dが開かれる。同一の推進力が次に細胞集団から分離されて増幅されたポリヌクレオチドを、第9C図について説明したような流通チャンネルのパターンの形態をなす検出領域199に案内するのに使用される。制

限された領域での減少された流れは増幅されたポリヌクレオチドの生成物の存在を積極的に示すのに役立ち、検出領域199を覆って配置されたガラスカバーを介して光学的に検出されることができる。他方、増幅されたポリヌクレオチドの生成物はパーキン エルマー社から市販されている“Taq Man”（登録商標）試薬等、上述の目的のために開発された商業的に市販されている試薬を用い、反応チャンバー内で直接に検出されることができる。また、増幅されたポリヌクレオチドは当該技術分野で公知の種々な方法、例えばエチジウム臭化物の存在下におけるアガロースゲル内での電気泳動法を用い、装置の外部で検出されることもできる。

第11B図には本件発明を実施する場合に有用な分析装置の他の実施形態が示されている。この装置210はメソ規模ポリヌクレオチド増幅領域222Aが微細形成された基体214を含む。この装置は第7図に示される取付け基部90と類似の取付け基部と組合せて使用されることができる。この取付け基部は装置210内の口部216A、216B、216C、216Dに接続された流通通路が設けられている。また、この取付け基部は口部216A、216B、216C、216Dが機械的に開閉されることを許容するバルブを含む。1つの実施形態において、装置の流通システムは液圧的に満杯に維持され、取付け基部内、又は装置自体内のバルブは流体の流れを案内するのに利用されることができる。チャンバー222AはPCRのために必要な脱交雑の温度、アニール及び重合の加熱を与えるのに適切な温度に加熱及び冷却される。反応領域の温度は第7図で説明したように制御されることができる。

第11B図に示される流通システムはここで説明される一般的な形式の、フィルター要素224を含み、分析の障害となる傾向のあるサンプル流体の濾過可能な成分を除去するようになっている。

操作において、PCRに必要なポリメラーゼ酵素及び他の試薬を含むサンプルは入口部216Aを介して反応チャンバー222Aに分配される。口部が閉じられると、加熱要素が次に脱交雑に適した温度と、アニール及び重合に適した温度との間で反応チャンバーを温度変動させるために利用されるPCR反応サイクルが終了すると、口部216B及び口部216Dが開かれ、チャンバー222Aの内容物を、例えばビーズ292に固定されたポリヌクレオチドの探子を含む検出領域222Bに送る。ポリヌクレオチドのための積極的な検定は検出領域内のビーズの凝集によって示される。

ポリヌクレオチド増幅はここではPCRを特に参照して説明されているが、本件発明の装置及びシステムが他の種々のポリヌクレオチド増幅反応にも効果的に等しく利用されることができることは当該技術分野の当業者には理解されるであろう。かかる他の反応はポリメラーゼ連鎖反応等の熱的に従属したものであるか、又はそれらの単温度（例えば、核酸連鎖に基づく増幅（NASBA））で

実行されることができる。さらに、かかる反応にはDNAリガーゼ、T7RNAポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素、その他を含む、広範な種々の増幅試薬及び酵素を採用できる。さらに、ポリヌクレオチドの変成は公知の化学的手法又は物理的手法自体、又はこれらと温度変化とを組合せた手法によって達成されることができる。本件発明の装置において実行されるポリヌクレオチド増幅反応は限定されるものではないが、次のものが含まれる：

- (1) 自立式連鎖複製（3SR）及び螺旋置換増幅（SAD）；
  - (2) 目標ポリヌクレオチドに固着される信号の増幅に基づく手法、例えば“分岐連鎖”DNA増幅（チロン社、エメリビル、CA）；
  - (3) 増幅又は探子DNAに基づく手法、例えばリガーゼ連鎖反応（LCR）及びQBレプリカーゼ増幅（QBR）；
  - (4) 転写に基づく手法、結紮活性化転写（NASBA）；及び
  - (5) 種々の他の増幅手法、例えば修復連鎖反応（RCR）及び繰返し探子反応（CPR）
- （これらの手法及びその商業上の販売の概要についてはジェネシスグループ、モントクレア、NJ；ザ・ジェネシス・レポート・DX、3巻第4号、2月1994の2～7頁参照）。

本件発明のサンプル前処理装置は本件出願と同時に出願された米国特許出願第08/308,199（代理人No. G1158）の主題である、メソ規模ポリヌクレオチド増幅装置と関連して使用されることができる。最後に説明した出願の開示全体はここで参照されることによって明確にされる。

簡単に言えば、最後に説明した特許出願のサンプル流体内の予め選択されたポリヌクレオチドの増幅のためのメソ規模装置に関する。この装置には約0.1～1000 $\mu$ mの断面寸法を少なくとも1つ有するポリヌクレオチド増幅チャンバーを含んで微細加工された基体が設けられている。また、この装置にはチャンバーにサンプルを導入するため、必要な場合にチャンバーを排気するため、選択的には装置から生成物又は廃棄物質を取り除くため、反応チャンバーと流体伝達関係にある少なくとも1つの口部が含まれている。反応チャンバーには予め選択されたポリヌクレオチドの増幅のために必要な試薬が設けられている。また、この装置には反応チャンバーの内容物を熱的に整えて予め選択されたポリヌクレオチドを増幅するための手段が含まれている。反応チャンバーは熱的な調整を促進するために高い体積表面比でもって形成されるのが好ましい。また、増幅反応チャンバーには必要な場合には反応チャンバーの壁面を構成する物質によって増幅反応が阻害されるのを抑制する混合物が含まれている。

また、第4図、第6A図、第6B図、第7図に各々示される取付け基部30、50、70、90は計量された量のサンプル、試薬、バッファ及び類似物を分配し、同時に上述の分析プロトコルの実行と関連して装置にサンプル又は他の流体をタイミングよく添加することを実行するのに利

用されることができる。これらの場合においてマイクロプロセッサが取付け基部に含まれる時、1つ又は一連の分析のためのデータを集めることを助けるのに使用されることができる。

分析対象物の確定は上記ではサンプル流体として全血を特に参照して説明されたが、この試料の分析対象物には例えば抗凝固剤を含む全血、希釈された全血、溶離された全血、検定試薬を含む全血、血清、血漿、尿、精液、髄液、羊水、洗浄液、組織抽出物、細胞懸濁液、及びここで述べられる装置及びシステムを用いて分析されるのに有益な他のサンプル流体等、その他の生物学的流体を含む、最初のものから変化した試験サンプル又は試料に存在するものが含まれる。

第12A図ないし第12D図にはここで説明された装置の流通通路内に配置されることのできる微細加工され、制限された流通のセパレータの各種の実施形態が示される。第12A図のセパレータは複数の仕切251の形態をなし、チャンネル253の対向表面252a、252bから突出し、チャンネルに沿って長手方向に整列された、一連の流通通路部分254a、254bを形成する。チャンネル250の底面から突出する1又は複数の中間仕切255が、1又は複数の仕切251の下流対面部分に隣接して配置され、整列された流通通路253によって設けられた流通通路内の障壁又はバッフルとして起立している。

比較的狭い流通通路254a、254bを比較的高速度で通過するサンプル流体は、平行仕切の間のスペース内に分散される一方、速度を減速し、かかるスペースのコーナーのデッドスペース内を移動する傾向にある。次に、サンプル流体が次の内部連続仕切のスペース内を通過すると、微粒子物質が各々デッドボリューム内に各々保留される。従って、その後の内部仕切スペース内の各通路により、微粒子物質は累積的に保留され、サンプル流体は仕切を通過して下流に流れると、次第に純化されるようになる。十分な数の仕切を一連に設けると、微粒子の濃度を段階的に減少させることが可能となり、その効率は予め設定されることができる。バッフル255によってデッドボリューム領域内でサンプル流体を案内することを補助できる。

第12C図には障壁257によって形成され、チャンネル250の底面256から突出するダム形式のセパレータ構造が示されている。

第12C図及び第12D図に示されるセパレータ構造は微粒子の性質を利用し、重力の影響で降下させるようになっている。これは赤血球の沈降分離を行うことによって全血の分析に特に有用である。サンプル流体が障壁257上の高速で通過した後、即座に減速する。チャンネル250の

床面に向けて降下した微粒子物質は、支持のより低い速度に遭遇し、渦流によって次に続く障壁を越える可能性が減少される。かかる一連の障壁を越えるサンプル流体の通路によって微粒子濃度が段階的に減少され、徐々に純化されたサンプル流体が生成されることができる。カバープレート260から吊り下げられた1又は複数の舌片はサンプル流体を下方に案内するのを補助する。

次の実施例は本件発明をより詳細に説明するために提供される。これらの実施例は例示であることを意図し、発明を限定するものではない。

#### 実施例 1

プラスチック・シリコン複合の検定装置はシリコン基体131を覆ってプラスチック（3M透明シート）カバーを取付けることによって組立てられ、第8A図に概略的に示すように、流通チャンネル132a、132bが微細加工され、チャンネルの両端には入口部133が微細加工されている。

(0.05Mソディウム・バイカーボネイト、pH9.6内への)抗A希釈溶液と、塩類へのA型血液の1:10希釈溶液とがホルダーを用い、シリンジを介してチャンネル132a、132bの対向端部の入口部133に導入された。溶液は中央チャンネル135と一緒に混合され、凝集が光学顕微鏡によってプラスチックカバーを通して観察された。その結果が下記表に示される。

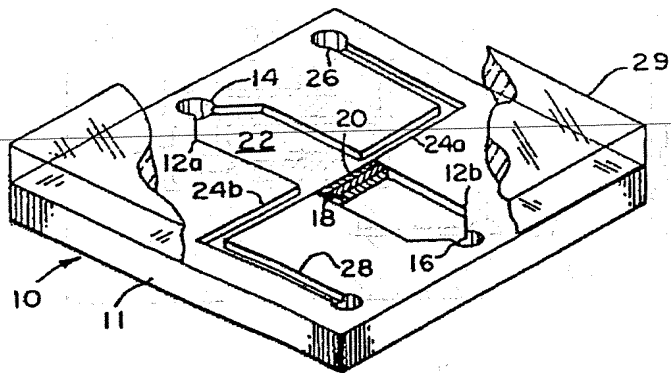
抗 A	希釈度	チャンネル内凝集
Gamma Kit	1:20	+
Gamma Murine Mono	1:20	+
Gamma Human Dilutin	1:5	+
Immucor Affinity pure	1:100	+
Immucor Ascites	1:100	+

#### 実施例 2

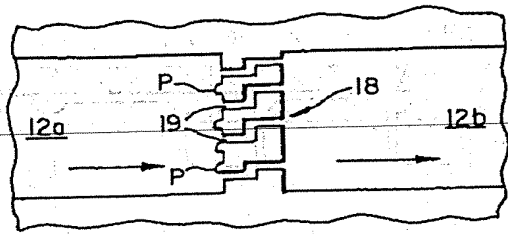
マウスIgG溶液（0.05Mソディウム・バイカーボネイト、pH9.6内に50 $\mu$ g/mL（SIGMA Cat. No. 1-5381）と、PBSバッファへのヤギ抗マウスIgG（H&L）-フルオレセイン・カルボキシレート・ビーズ（ポリサイエンス社）の1:20希釈溶液が実施例1での説明のように準備された他の検定装置のチャンネル132a、132bの対向端部の入口部にホルダーを用い、シリンジを介して導入された。溶液は反応/検出領域135と一緒に混合され、凝集が光学顕微鏡によってプラスチックカバーを通して観察された。

本件発明の特定の実施形態が上記で説明され及び/又は例示されたが、上述の説明から当該技術分野の当業者には種々の他の実施形態が明らかであろう。従って、本件発明は説明され及び/又は例示された特定の実施形態に限定されず、請求の範囲に記載の範囲内において種々の変形及び改良が可能である。

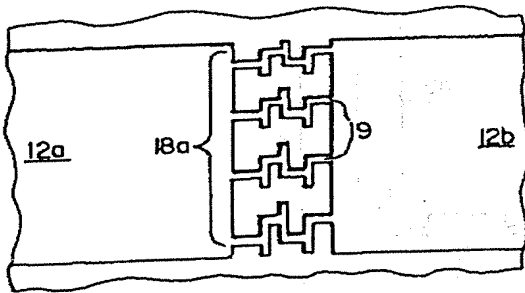
【第 1 図】



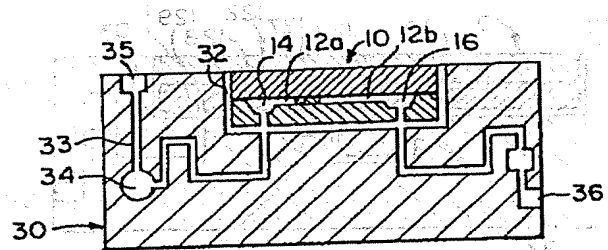
【第 2 図】



【第 3 図】

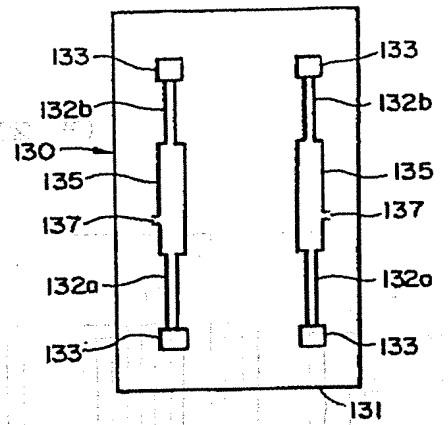
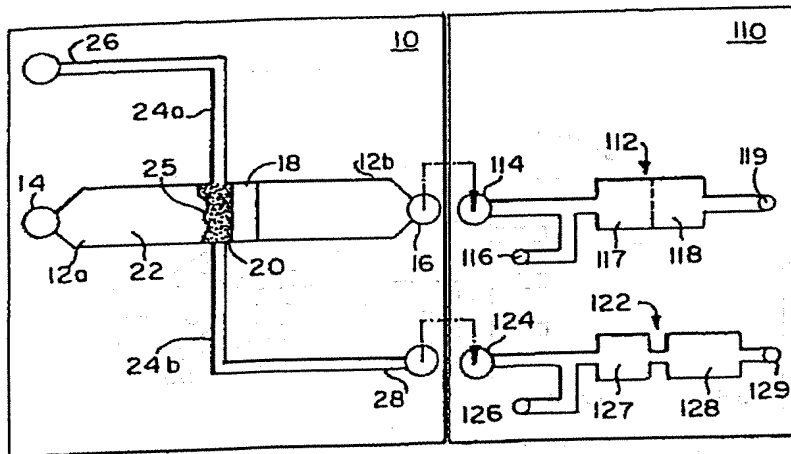


【第 4 図】



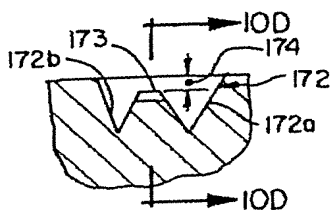
【第 8 A 図】

【第 5 図】

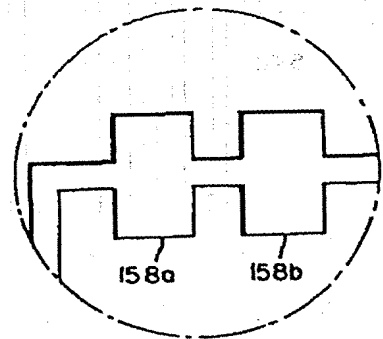
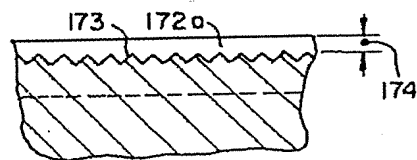


【第 9 B 図】

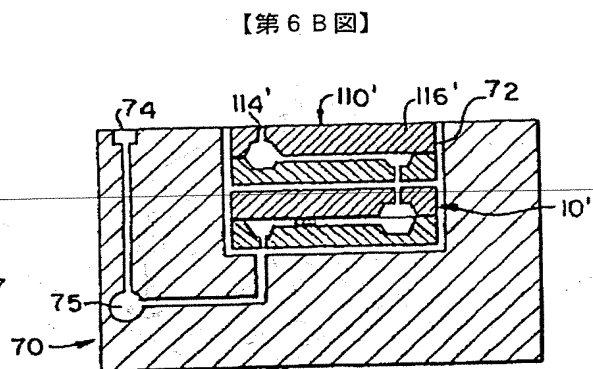
【第 10 C 図】



【第 10 D 図】

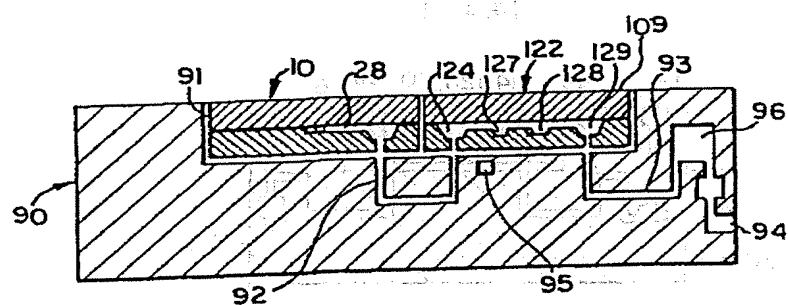


【第6A図】

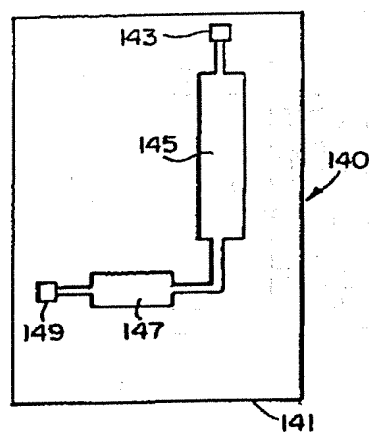


【第 6 B 図】

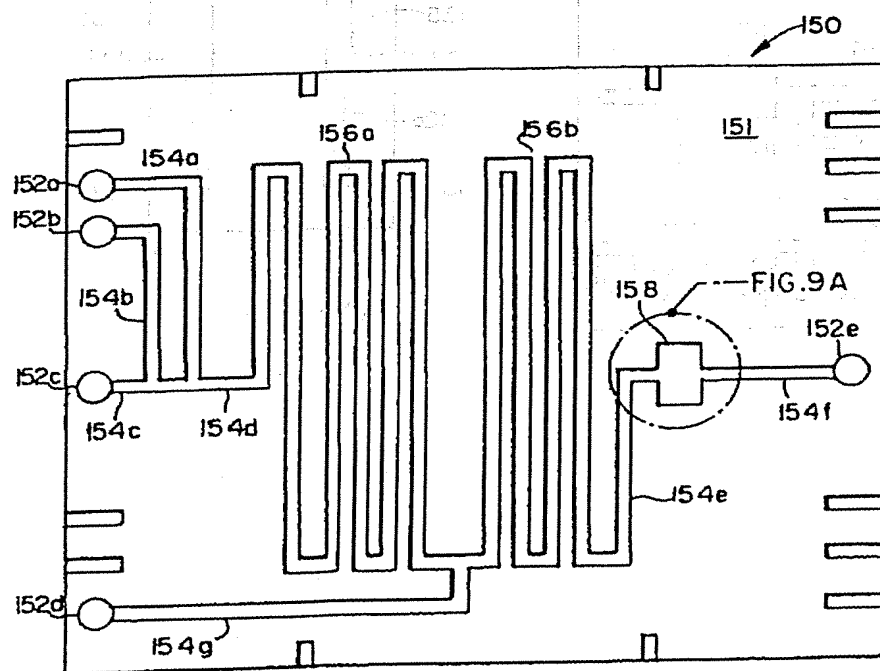
【第7図】



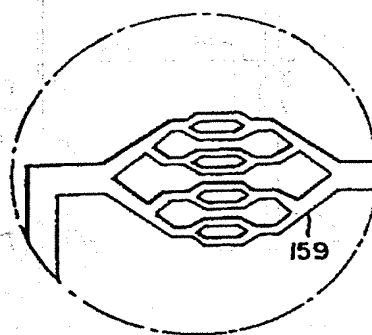
【第8B図】



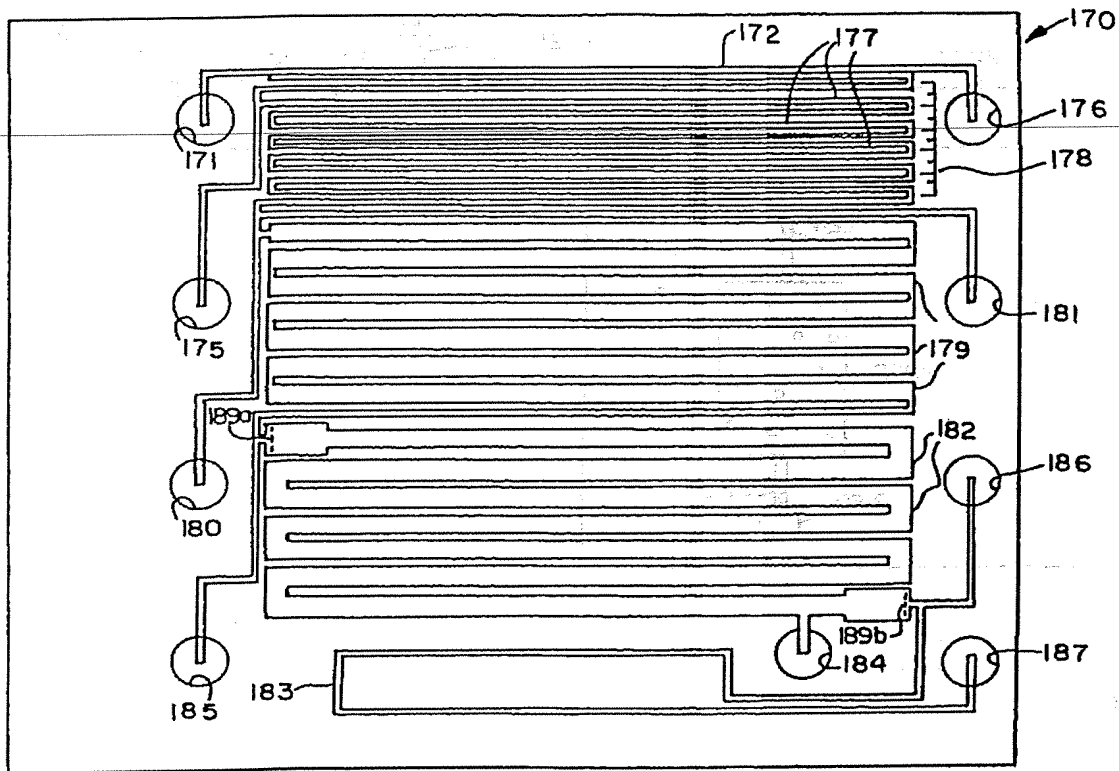
【第9図】



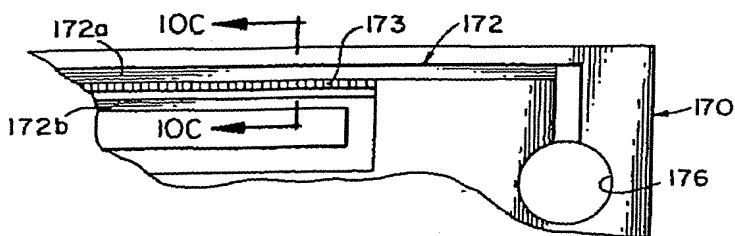
【第9C図】



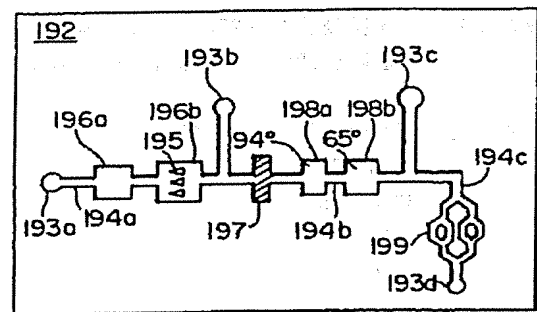
【第10A図】



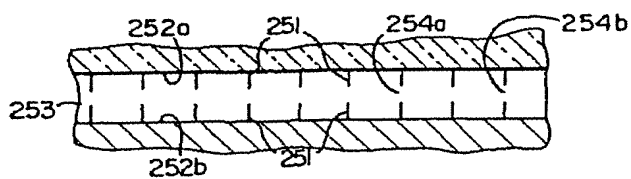
【第10B図】



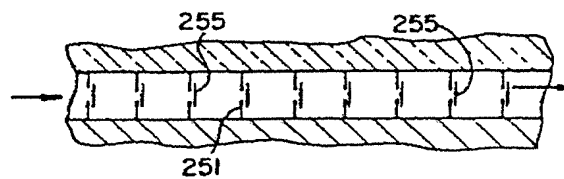
【第11A図】



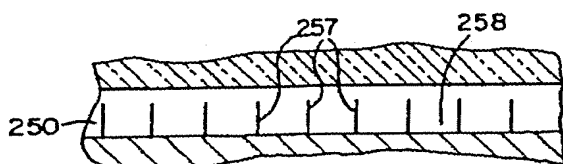
【第12A図】



【第12B図】

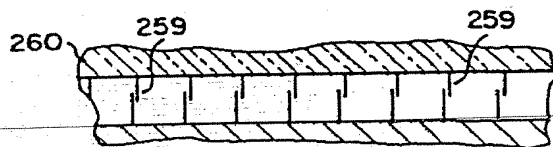
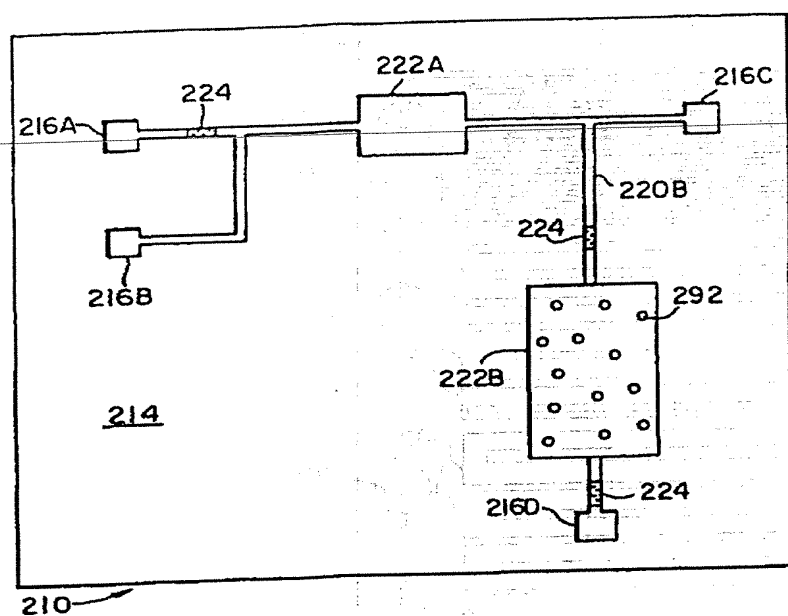


【第12C図】



【第 1 1 B 図】

【第 1 2 D 図】



フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 3 3 8, 7 2 8  
 (32) 優先日 平成 6 年 11 月 14 日 (1994. 11. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

- (56) 参考文献 米国特許 4676274 (U S, A)  
 国際公開 93/22053 (W O, A 1)

- (58) 調査した分野 (Int. Cl. <sup>7</sup>, D B 名)

G01N 33/48

B01D 35/02

B01L 11/00

C12M 1/00

C12Q 1/68

W P I (D I A L O G)